

Studien zur Transfektion von
Schistosoma mansoni (Digenea)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Biologe

Oliver Heyers

06.12.1971 in Aachen

Präsident der Humboldt-Universität

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Michael Linscheid

1. Gutachter: Prof. Dr. Richard Lucius
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Uckert
3. Gutachter: PD Dr. Frank Seeber

Tag der mündlichen Prüfung: 17.05.04

Zusammenfassung

Schistosomen verursachen die Tropenparasitose Schistosomiasis mit 250-300 Millionen infizierten Menschen weltweit. Zur Analyse von Genfunktionen, durch die wirksame Medikamente entwickelt werden könnten, wird ein System zur Herstellung transgener Schistosomen benötigt. In dieser Arbeit wurde daher versucht, ein System zur Transfektion von *Schistosoma mansoni* von der transienten Expression von Reportergenen ausgehend zu entwickeln. Die Funktionalität der hergestellten Plasmide zur transienten Transfektion wurde durch die Expression der Reporter *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) und β -Galactosidase unter der Kontrolle der schistosomalen Promotoren für das Calreticulin, die 28 kDa-Glutathion-S-Transferase und das 70 kDa-Hitzeschockprotein in *cos7*-Zellen nachgewiesen. Für den Gentransfer in *S. mansoni* wurden Mikroinjektion, Elektroporation und Mikroprojektilbeschuss eingesetzt. Der Mikroprojektilbeschuss erwies sich als geeignete Methode, Plasmid-DNA zur transienten Expression von EGFP und β -Galaktosidase in adulte und larvale Stadien zu transferieren. Da die beobachtete Reportergenexpression schwach war, wurde durch den Einsatz von *Discosoma Red Fluorescent Protein* (DsRed) als Reportergen versucht, das Transfektionssystem zu optimieren. Außerdem wurden die potentiellen Promotoren für das Cathepsin D und für ein Aktin durch inverse PCR aus genomischer DNA isoliert. Die Funktionalität dieser Promotoren wurde in *cos7*- bzw. *HeLa*-Zellen nachgewiesen, eine verbesserte Expression in *S. mansoni* dagegen wurde mit diesen zwei Promotoren und unter Einsatz von DsRed nicht erreicht. Da *S. mansoni* sich *in vitro* nicht kultivieren lässt, muss für die Etablierung eines Transfektionssystems ein in seinen Keimzellen transgenes Stadium in den Lebenszyklus eingeschleust werden. Durch Mikroprojektilbeschuss transfizierte Mirazidien (freilebende Stadien des Parasiten) infizierten Zwischenwirtsschnecken und entwickelten sich zu transgenen Sporozysten, was durch die Transkription von EGFP nachgewiesen wurde. Für eine stabile Integration in das Genom werden unter anderem mobile genetische Elemente eingesetzt. *Boudicca* ist ein endogenes *long terminal repeat* (LTR) Retroelement. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es in adulten Würmern, Sporozysten und Zerkarien transkribiert wird. Das LTR kann *in vitro* als Promotor zur Expression von EGFP eingesetzt werden. Außerdem wurde eine transkribierte Kopie kloniert und analysiert. Die in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse weisen darauf hin, dass *Boudicca* als Vektor zur stabilen Transfektion von *S. mansoni* eingesetzt werden kann.

Schistosoma mansoni

transgene Parasiten

GFP

Gene Gun

Transfektion

Retrotransposon

LTR

Boudicca

Abstract

Schistosomiasis caused by schistosomes affects about 250-300 million people world wide. The establishment of a transgenesis system for schistosomes is a prerequisite to the identification of new drug targets and to the analysis of gene regulation and will add to our knowledge of parasite physiology and development. In this study, plasmids expressing Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) and β -galactosidase driven by the schistosomal promoters of the calreticulin, the 28kDa-glutathione-S-transferase and the 70kDa-heatshock protein were cloned and successfully tested in *cos7*-cells. Microinjection, electroporation and particle bombardment were used to introduce plasmid DNA into *Schistosoma mansoni*. Adult and larval stages of *S. mansoni* subjected to particle bombardment transiently expressed the reporter genes, although the observed transfection rates were very low. To optimize the transfection system Discosoma Red Fluorescent Protein (DsRed) was used as a reporter gene. Furthermore, the schistosomal promoters of the aspartic protease cathepsin D and a cytoplasmatic actin gene were isolated from genomic DNA using inverse PCR. The isolated promoters were able to drive EGFP and DsRed expression in *cos7*- or *HeLa*-cells, but improved expression could not be observed in *S. mansoni*. Due to the complexity of the life cycle *S. mansoni* cannot be cultured *in vitro*. In order to develop a transgenesis system for schistosomes, the life cycle must consequently be completed by genetically modified parasites. In this study it was shown that the free-living and mobile miracidium that infects the intermediate host snail could be transformed by particle bombardment and reintroduced in the life cycle using the natural path of infection. Development into transgenic sporocysts was shown through the isolation of EGFP transcripts from intermediate host snails. Mobile genetic elements are used as molecular tools to achieve stable integration of a foreign gene into a genome. *Boudicca* is an endogeneous long-terminal repeat (LTR) transposon in the schistosomal genome. In this study it was shown that it is transcribed in adult worms, sporocysts and cercariae. The LTR drives EGFP expression in cell cultures. Furthermore, a *Boudicca* transcript was cloned and analyzed by sequencing. The results suggest that *Boudicca* can be used as a molecular tool for stable integration of transgenes into the schistosomal genome.

Schistosoma mansoni

transgenic parasite

GFP

particle bombardment

long terminal repeat

retrotransposon

transformation

Boudicca

Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	14
1.1 Die Tropenparasitose Schistosomiasis	14
1.2 Der Lebenszyklus von <i>Schistosoma mansoni</i>	15
1.3 Krankheitsverlauf und Kontrolle der Schistosomiasis	16
1.4 Das schistosomale Genom	18
1.5 Versuche zur Transfektion von <i>S. mansoni</i>	19
1.6 Stabile Transfektion mit Hilfe von mobilen genetischen Elementen	22
1.7 Ziele dieser Arbeit	24
2 Ergebnisse	25
2.1 Herstellung von Vektoren zur Expression von EGFP und β -Galaktosidase unter der Kontrolle schistosomaler Promotoren	25
2.1.1 Isolation des CAL-, des GST28- und des HSP70-Promotors aus genomischer DNA	25
2.1.2 Subklonierung der Promotoren und Sequenzierung	26
2.1.3 Herstellung von promotorlosen Kontrollplasmiden	27
2.1.4 Herstellung von Plasmiden zur Expression von EGFP und β -Galaktosidase	27
2.1.5 Überprüfung der Expression von EGFP und β -Galaktosidase in <i>cos7</i> -Zellen	28
2.1.6 Endogene β -Galaktosidase-Aktivität in <i>S. mansoni</i>	32
2.1.7 Ermittlung der Promotorstärke in der Zellkultur	33
2.1.8 Herstellung eines durch Hitzeschock aktivierbaren Plasmids zur Expression von EGFP	34
2.2 Entwicklung eines Systems zur genetischen Transfektion von <i>S. mansoni</i>	35
2.2.1 Mikroinjektion	35
2.2.2 Elektroporation	37
2.2.3 Mikroprojektilbeschuss	40
2.2.3.1 Nachweis der Reportergenaktivität in adulten Würmern und Sporozysten	41
2.3 Versuche zur Optimierung der Expression von Reportergenen in <i>S. mansoni</i>	49
2.3.1 Klonierung der 5'-UTR des Cathepsin D-Gens	50
2.3.2 Klonierung der 5'-UTR eines Aktin-Gens	52
2.3.3 Einsatz von DsRed als Reporter	55

2.3.4	Herstellung von Plasmiden unter Einsatz der 5'-UTRs des Cathepsin D- und des Aktin-Gens und von DsRed als Reportergen.....	55
2.3.5	Überprüfung der Plasmide in der Zellkultur	57
2.3.6	Transfektion von <i>S.mansoni</i> mit den DsRed-Konstrukten und den Aktin und Cathepsin D-Promotorkonstrukten	59
2.4	Versuche zum Einschleusen von transgenen Mirazidien in den Lebenszyklus.....	59
2.4.1	Überprüfung des Mikroprojektilbeschusses <i>in vitro</i>	59
2.4.2	Überprüfung des Mikroprojektilbeschusses <i>in vivo</i>	60
2.4.2	Nachweis der Reportergenaktivität in der Zwischenwirtsschnecke.....	62
2.4.3	Überprüfung der Transfektion von Keimballenzellen	65
2.5	Versuche zur Charakterisierung des endogenen Retrotransposons <i>Boudicca</i>	65
2.5.1	Nachweis von <i>Boudicca</i> -Transkription in adulten Würmern, Zerkarien und Sporozysten.....	66
2.5.2	Überprüfung der Promotorfunktion des <i>long terminal repeats</i> (LTR) in der Zellkultur...	68
2.5.3	Klonierung eines vollständigen <i>Boudicca</i> -Transkriptes.....	69
3	Diskussion	73
3.1	Entwicklung eines Transfektionssystems für Schistosomen	73
3.2	Versuche zu einer transienten Transfektion	77
3.2.1	Expression unter der Kontrolle der eingesetzten schistosomalen Promotoren	77
3.2.2	Eignung der eingesetzten Reporter als Transfektionsmarker.....	88
3.3	Wege zu einer stabilen Transfektion	92
3.3.1	Transfektion von Keimzellen und Einschleusen eines transgenen Stadiums in den Lebenszyklus.....	93
3.3.2	Integrationen in das schistosomale Genom und Etablierung transgener Linien.....	96
3.3.2.1	Charakterisierung des endogenen Retrotransposons <i>Boudicca</i>	99
4	Ausblick	104
5	Methoden und Materialien	106
5.1	Methoden.....	106
5.1.1	Methoden zur Haltung von <i>Schistosoma mansoni</i>	106
5.1.1.1	Experimenteller Lebenszyklus	106
5.1.1.2	Gewinnung und <i>in vitro</i> -Kultur adulter Würmer	106
5.1.1.3	Gewinnung von Schistosomeneiern, Mirazidienschlupf und Sporozystenkultur	107
5.1.2	Methoden zur genetischen Transformation von <i>S. mansoni</i>	108
5.1.2.1	Mikroinjektion	108

5.1.2.2	Elektroporation.....	108
5.1.2.3	Mikroprojektilbeschuss	109
5.1.3	Molekularbiologische Methoden.....	112
5.1.3.1	Kultur und Lagerung von <i>Escherichia coli</i>	112
5.1.3.1.1	Flüssigkultur und Kultur auf Agar-Festplatten	112
5.1.3.1.2	Glyzerin-Gefrier-Kulturen	112
5.1.3.2	Isolation von RNA.....	112
5.1.3.3	Verdau mit RNase freier DNase	113
5.1.3.4	Umschreiben der RNA in cDNA.....	113
5.1.3.5	Isolation von genomischer DNA.....	113
5.1.3.6	Isolation von Plasmid-DNA	114
5.1.3.7	Restriktion von DNA	114
5.1.3.8	Agarosegelelektrophorese	115
5.1.3.9	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	115
5.1.3.10	Reinigung und Fällung von RNA und DNA.....	115
5.1.3.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	116
5.1.3.12	Glätten von 5'-überhängenden Restriktionsschnittstellen.....	116
5.1.3.13	Dephosphorylierung.....	116
5.1.3.14	Ligation	117
5.1.3.15	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i>	117
5.1.3.16	Transformation von <i>E. coli</i>	117
5.1.3.17	Selektion transformierter <i>E. coli</i> -Bakterien	118
5.1.3.17.1	Blau-Weiß-Screening	118
5.1.3.17.2	Kolonie-PCR	118
5.1.3.17.3	Restriktionsanalyse	118
5.1.3.18	Sequenzanalyse.....	119
5.1.3.19	Polymerase-Kettenreaktion	119
5.1.3.19.1	Primerdesign.....	120
5.1.3.19.2	Klonierung von PCR-Produkten.....	120
5.1.3.19.3	Inverse PCR.....	120
5.1.4	Zellbiologische Methoden.....	121
5.1.4.1	Zellkultur.....	121
5.1.4.1.1	Kultur von <i>HeLa</i> - und <i>cos7</i> -Zellen	121
5.1.4.1.2	Einfrieren von Zellen.....	121
5.1.4.1.3	Zellzahlbestimmung.....	121
5.1.4.1.4	Methoden zur genetischen Transformation von Zellen.....	121
5.1.4.1.4.1	A) DEAE-Dextran.....	121
5.1.4.1.4.2	B) Lipofektion	122
5.1.4.1.4.3	C) Elektroporation.....	122

5.1.4.2	Mikroskopie.....	123
5.1.4.3	Methoden zur histologischen Untersuchung.....	123
5.1.4.3.1	Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität in fixierten Zellen und Geweben	123
5.1.4.3.2	Gefrierschnitte.....	123
5.1.4.3.3	Paraffinschnitte	124
5.1.5	Biochemische Methoden	124
5.1.5.1	Proteingestamtextraktion aus <i>B. glabrata</i> und <i>S. mansoni</i>	124
5.1.5.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	124
5.1.5.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	124
5.1.5.4	Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität im Proteingestamtextrakt.....	125
5.1.6	Immunologische Methoden.....	125
5.1.6.1	Western-Blot	125
5.1.6.2	Immunhistochemie	126
5.1.7	Datenverarbeitung.....	126
5.2	Materialien	127
5.2.1	Laborgeräte	127
5.2.2	Verbrauchsmaterialien.....	127
5.2.3	Reagenzien	128
5.2.4	Enzyme.....	129
5.2.5	Kommerzielle Kits	129
5.2.6	Primer	130
5.2.7	Agarosegelelektrophoresepuffer	131
5.2.8	Puffer für Plasmidpräparationen nach Willimzig (1985).....	131
5.2.9	Bakterien und Zelllinien.....	131
5.2.10	Plasmide.....	131
5.2.11	Bakterienkultur-Medien.....	132
5.2.12	SDS-Polyacrylamid-Gele	133
5.2.13	Immunoblot.....	134
5.2.14	Medien für die Zellkultur	134
5.2.15	Mikroinjektionspuffer	135
5.2.16	Puffer für die β -Galaktosidase-Färbung.....	135
5.2.17	Puffer für die Immunhistochemie.....	136
5.2.18	Tiere und Medien zu ihrer Haltung.....	136
6	Literaturverzeichnis.....	138
	Sequenzen.....	161
	Klonierungsschemata	165

Publikationen und Tagungsbeiträge.....	167
Lebenslauf	168
Erklärung.....	169
Danksagung.....	170

Abkürzungsverzeichnis

amp	Ampicillin
AP-1	activator protein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
beta-Gal	beta-Galaktosidase
BAC	bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaar
Bge -	Biomphalaria glabrata embryonic -
Blaulicht	Licht der Anregungswellenlänge 490 nm
BSK	Bluescript SK+
CAL	Calreticulin
CMV	Cytomegalovirus
cDNA	komplementäre DNA
CPRG	Chlorophenol-Rot-b-D-Galactopyranosid
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-HCl
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos MEM
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DsRed	Discosoma Red Fluorescent Protein
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
(E)GFP	(Enhanced) Green Fluorescent Protein
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
env	envelope
EST	expressed sequence tag
F1/2	Nachkommen der ersten/zweiten Generation
FCS	Fetales Kälberserum

FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
g	Gravitationskraft
gag	group specific antigene
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Grünlicht	Licht der Anregungswellenlänge 546 nm
GST28	28 kDa-Glutathion-S-Transferase
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSP70	70 kDa-Hitzeschockprotein
i	invers
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid
kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertoni-Broth
LTR	long terminal repeat
MCS	multiple cloning site
MEM	modified eagle medium
MEMSE-J	Sporozystenkulturmedium
M-MLV	Moloney Maus Leukämie Virus
MGE	mobiles genetisches Element
mRNA	messenger RNA
NF-Y	Nuclear factor Y
nt	Nukleotide
oP	ohne Promotor
ORF	offener Leserahmen
p	Plasmid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS-(T)	Phosphatgepufferte Lösung (mit Triton X-100)
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
pol	poly protein
polyA	Polyadenylierungsstelle
RC	RT-PCR product
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RNAi	RNA interference
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SINE	short interspersed nuclear element
SL	spliced leader RNA
SV	simian virus
Taq	Thermophilus aquaticus
TB	Terrific Broth
TBS	Tris buffered solution
TELT	Tris/HCl;EDTA;LiCl;Triton-X-100
TEMED	Tetramethylethylenediamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	enzymatische Einheit (Unit)
UTR	untranslated region (nicht translatierte Region)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-indonyl-β-D-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Die Tropenparasitose Schistosomiasis

Die Schistosomiasis ist eine seit dem Altertum bekannte Tropenparasitose (Farooq, 1973), die nach der Erstbeschreibung durch den deutschen Arzt Theodor Bilharz auch als Bilharziose bezeichnet wurde. Sie wird hervorgerufen durch Trematoden der Gattung *Schistosoma*. Die vier wichtigsten humanpathogenen Arten dieser Gattung sind *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium* und *S. intercalatum*. Die Hauptverbreitungsgebiete von *S. mansoni*, der Gegenstand dieser Arbeit ist, liegen in Afrika, der Karibik und der südamerikanischen Ostküste (Abb. 1.1). Diese Verbreitung ist durch den Zwischenwirt, eine Wasserlungenschnecke der Gattung *Biomphalaria*, bestimmt, zu der eine strenge Wirtsspezifität besteht. Diese Schnecke benötigt Wassertemperaturen oberhalb von 24°C, wodurch die Schistosomiasis mit 250-300 Millionen infizierten Menschen ausschließlich in den Tropen und Subtropen verbreitet ist. Heutzutage tritt sie in 76 Ländern auf, weltweit leben 600 Millionen Menschen in den Endemiegebieten. Obwohl sich das Verbreitungsgebiet der Schistosomiasis in den letzten 50 Jahren durch Programme der WHO zur Gesundheitserziehung und Medikamentenbehandlung verändert hat, konnten diese hohen Zahlen an unmittelbar von der Schistosomiasis betroffenen Personen in den Endemiegebieten und an Infizierten nicht verringert werden (Berquist, 2002; Zhou et al., 2002; Berquist und Colley, 1998). 10 % der Erkrankten weisen schwere Krankheitssymptome auf. Pro Jahr sterben 0,3 bis 0,5 Millionen Menschen an den direkten Folgen der Schistosomiasis (Chlichlia et al., 2002). Die Schistosomiasis ist damit nach der Malaria die Tropenparasitose mit den zweitgrößten ökonomischen und sozialen Folgen weltweit. Unter den durch parasitische Helminthen verursachten Krankheiten ist sie die wichtigste (Engels et al., 2002; Chitsulo et al., 2000; Crompton, 1999). Die Infektion des Menschen erfolgt durch die im kontaminierten Wasser freischwimmenden Schistosomenlarven, die aktiv durch die Haut eindringen. Die Bewirtschaftung von Reisanbaugebieten sowie der Bau von Bewässerungssystemen, Staudämmen und Kanalsystemen und der falsche Umgang mit Abwässern stellen daher ernstzunehmende Infektionsquellen für den Menschen dar (Magnussen, 2003; Patz et al., 2000).

1.2 Der Lebenszyklus von *Schistosoma mansoni*

Schistosomen gehören zur Familie der getrenntgeschlechtlichen Pärchenegel (Schistosomatidae). Der heteroxene Entwicklungszyklus (Abb. 1.1) schließt zwei freischwimmende Larvenstadien ein, die aktiv in den Zwischenwirt und den Endwirt eindringen. Er ist gekennzeichnet von einer geschlechtlichen Vermehrung in dem Vertebraten-Endwirt und einer ungeschlechtlichen



Abb. 1.1: Lebenszyklus und Verbreitung von *S. mansoni*

Massenvermehrung im Gastropoden-Zwischenwirt. Wichtigster Zwischenwirt von *Schistosoma mansoni* innerhalb der Gattung *Biomphalaria* ist die Art *Biomphalaria glabrata* (Knight et al., 2000); Endwirt im natürlichen Lebenslauf ist der Mensch. Im Laborzyklus wird der natürliche Endwirt durch die Maus (*Mus musculus*) oder die Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*) ersetzt.

Die adulten Würmer leben in den Mesenterialvenen des Endwirts. Die Weibchen, die nach der Paarung zeitlebens in einer Dauerkopula in der Bauchfalte der Männchen liegen, legen dort täglich 100-300 Eier ab. Die Weibchen nehmen stündlich bis zu 300000 Erythrozyten auf (Lawrence, 1973). Die Aminosäuren, die sie durch Abbau des Hämoglobins gewinnen, werden für Wachstum und Eiproduktion benötigt. Die mit einem Seitenstachel und lytischen Enzymen (Sturrock, 1993) ausgestatteten reifen Eier gelangen durch Entzündungsprozesse in das Darmlumen und werden mit dem Fäzes ausgeschieden. Durch veränderte Licht- und Osmoseverhältnisse angeregt schlüpfen die sich in den Eiern entwickelnden Mirazidien, die dann aktiv den Zwischenwirt aufsuchen. Mit Hilfe von Sekreten aus einer Apikaldrüse heftet sich das Mirazidium an die Zwischenwirtsschnecke und dringt unter Abstreifen des Wimpernepithels ein. An der Eintrittsstelle erfolgt die Transformation zur Primärsporozyte (Muttersporozyste). Die Muttersporozyste ist angefüllt mit Keimballen, in denen undifferenzierte, diploide Zellen liegen. Aus diesen undifferenzierten Zellen entwickeln sich innerhalb von 8 Tagen die Sekundärsporozysten (Tochterporozysten) (Sturrock et al., 1993), die beweglich sind und die Mitteldarmdrüse der Schnecke aufsuchen. Aus den Keimballenzellen in den Tochterporozysten können weitere Tochterporozysten oder aber zahlreiche Zerkarien entstehen. Die für den Endwirt infektiösen Gabelschwanzzerkarien verlassen die Schnecke aktiv und suchen chemotaktisch angelockt den Endwirt auf (Haas et al., 1997). Unter Abwerfen des Gabelschwanzes und mit Hilfe von sekretierten proteolytischen Enzymen wie zum Beispiel Elastasen (McKerrow et al., 1985) dringt die Zerkarie in die Haut des Endwirts ein und wandelt sich in ein Schistosomulum um. Nach einer Körperwanderung im venösen Blutkreislauf über Lunge und linke Herzkammer und nach einer Längenzunahme werden die getrennt geschlechtlichen Tiere in die Pfortadern geschwemmt, wo die Paarung stattfindet. Letztlich erfolgt die endgültige Ansiedelung der Wurmpaare in den Mesenterialvenen des Darms, in denen die Eiablage durch taktile und chemische Reize ausgelöst wird.

1.3 Krankheitsverlauf und Kontrolle der Schistosomiasis

Die Schistosomiasis ist in erster Linie eine chronische Erkrankung, die durch die in das Blutgefäßsystem abgelegten Eier hervorgerufen wird. Erste Krankheitssymptome werden durch die Invasion des Parasiten hervorgerufen (Ross et al., 2002). Daran

schließt sich eine akute Phase der Schistosomiasis an, die bei einer starken Infektion mit *S. japonicum* von Fieber gekennzeichnet ist (Katayama-Fieber) (Doherty et al., 1996). Diese akute Phase geht schließlich in die chronische Schistosomiasis über (Lambertucci et al., 2000). Typische Merkmale einer starken chronischen Infektion sind Hepatosplenomegalie, Ascites und Varizen (de Jesus et al., 2002; Lambertucci et al., 2000; Lambertucci, 1993). Weitere Komplikationen ergeben sich bei Koinfektionen mit Staphylococcen, Hepatitis B und C und Salmonellen (Ross et al., 2002; Gad et al., 2001; Lambertucci et al., 2000). Bei der Neuroschistosomiasis kommt es in Folge von Infektionen im Kindesalter zu geistiger Retardierung und Wachstumsstörungen (Lambertucci et al., 2000; Doebling, 1988). Die intestinale Schistosomiasis verläuft in 1 % der Fälle tödlich. Bei der Todesursache spielen innere Blutungen durch aufplatzende Varizen und die indirekte Beteiligung am Auftreten von Darmkarzinomen bei *S. mansoni* und von Blasenkarzinomen bei *S. haematobium* eine Rolle (Ross et al., 2002).

Für die Behandlung der Schistosomiasis steht seit den 70er Jahren das gut verträgliche Chemotherapeutikum Praziquantel zur Verfügung (Cioli und Pica-Mattoccia, 2003). Die Chemotherapie ist für den einzelnen Patienten erfolgreich, stellt aber keine wirksame Lösung für die Bekämpfung der Schistosomiasis dar. Durch die hohe Reinfektionsrate in den Endemiegebieten ist zur vollständigen Eliminierung der Schistosomen die Durchführung von Massenbehandlungen mit Praziquantel bis zu alle drei Monate notwendig (WHO, 1996). Zudem besitzt es eine sehr kurze Halbwertszeit im menschlichen Körper und tötet nicht die juvenilen Würmer ab (Ross et al., 2002). Ein weiteres Problem ist das Auftreten von Schistosomenstämmen, die resistent gegenüber der Behandlung durch Praziquantel sind (Doenhoff et al., 2002; William et al., 2001; King et al., 2000; Ismail et al., 1999). Die Eindämmung der Schistosomiasis durch Bekämpfung der Zwischenwirte mit Molluskiziden ist kostenaufwendig und die ökologischen Folgen sind nicht abschätzbar (Ross et al., 2002; Morgan et al., 2001; Cioli et al., 1995). Eine Alternative zur Bekämpfung der Schistosomiasis wäre eine Vakzine, die derzeit noch nicht auf dem Markt ist (Ross et al., 2002; Capron et al., 2001).

Parallel zu diesen konventionellen Ansätzen, die bis in die Gegenwart zur Bekämpfung der Schistosomiasis eingesetzt werden, besteht ein neuer Ansatz darin,

die Biologie der Schistosomen auf molekularer Ebene zu untersuchen. Dadurch sollen neue Angriffspunkte im Stoffwechsel des Parasiten gefunden werden und die Entwicklung von neuen Medikamenten und Vakzinen und einer verbesserten Diagnostik ermöglicht werden, um eine wirksame Langzeitstrategie zur Bekämpfung der Schistosomiasis zu entwickeln (Engels et al., 2002; Colley et al., 2001; Franco et al., 2000). Diese Strategie weist erste Erfolge auf: Es wurde nachgewiesen, dass eine Erhöhung der Expression der Untereinheit I der Cytochrom C-Oxidase möglicherweise eine Praziquantel-Resistenz bewirkt (Pereira et al., 1998). Der molekularbiologische Ansatz trägt auch zur Untersuchung der Interaktionen zwischen *S. mansoni* und der Zwischenwirtsschnecke *B. glabrata* bei (Raghavan et al., 2003; Jones et al., 2001; Knight et al., 1999).

1.4 Das schistosomale Genom

Um die Sequenzierung von Schistosomen zu koordinieren, wurde 1992 das *Schistosoma Genome Network* als internationales Konsortium von der WHO mit dem Ziel gegründet, *expressed sequence tags* (ESTs) aus den verschiedenen Stadien einschließlich männlicher und weiblicher adulter Würmer, Zerkarien, Mirazidien, Sporozysten und Schistosomula zu sequenzieren (Dias-Neto et al., 2000; Franco et al., 1995). Außerdem wurde eine *bacterial artificial chromosome* (BAC)-Bank von *S. mansoni* angelegt und es wurde begonnen, genomische Sequenzen zu analysieren (Le Paslier et al., 2000).

S. mansoni hat ein sehr großes und komplexes Genom. Das haploide Genom besitzt eine Größe von 270 Mb (Simpson et al., 1982) und ist damit 2,7 mal größer als das Genom von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998) bzw. 2,3 größer als das Genom von *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000). Es ist organisiert in 7 Paaren Autosomen und einem Paar Geschlechtschromosomen, wobei Männchen homozygot (ZZ) und die Weibchen heterozygot (ZW) sind (Hirai et al., 2000; Grossman et al., 1981 a und b). Das Genom besteht zu 65 % aus den Nukleotiden A und T und enthält 60 % repetitive Sequenzen, die in 100-1000000 Kopien vorliegen (Simpson et al., 1984; Simpson et al., 1982). Es gibt ca. 20000 exprimierte Gene (Franco et al., 2000). Durch Sequenzierung von ESTs wurden bisher 15-20 % der schistosomalen Gene katalogisiert (Johnston et al., 1999). Die Expression vieler Gene ist stadienspezifisch.

Für die Entwicklung einer Diagnose, Chemotherapie oder Immunoprophylaxe sind konstitutiv in mehreren Stadien exprimierte Gene geeignet (Fan et al., 1998; Franco et al., 1997). 30-60 % der ESTs stellen neue schistosomale Gene dar. Weil 80 % dieser Gene keine Homologien zu den Genen anderer Organismen, die in den Datenbanken veröffentlicht sind, zeigen (Shabaan et al., 2003; Merrick et al., 2003; Santos et al., 1999; Franco et al., 1995) und sogar in einem häufig vorkommenden Transkript aus *S. mansoni* Homologien zu bekannten Genen fehlen (Meira et al., 1998), ist es schwierig die Funktionen dieser Gene allein aus der Sequenz herzuleiten.

1.5 Versuche zur Transfektion von *S. mansoni*

Die molekulare Funktion und die biochemische Aktivität eines Gens können *in vitro* analysiert werden (Franco et al., 2000). Um die biologische Funktion, die ein Protein in dem Organismus erfüllt, zu analysieren, sind *in vivo* Analysen notwendig. Ein großes Hindernis in dieser Hinsicht stellt bei Schistosomen das Fehlen von *knockout* Techniken dar. Transgene Würmer, in denen auf Grund von Überexpression oder Ausschalten von Genen Phänotypen auftreten, die einen Rückschluss auf die Funktion des ausgeschalteten oder überexprimierten Gens zuließen, könnten insbesondere einen wichtigen Beitrag bei der Aufklärung der Funktion von Genen leisten, die keine Homologie zu anderen Genen in Datenbanken besitzen (Franco et al., 2000). Technisch wurden diese Probleme bislang für Schistosomen durch den Einsatz von Hefen für Genfunktionsstudien, für die die Technik zum Ausschalten von Genen zur Verfügung steht (Winzeler et al., 1999), gelöst. Es wurde nachgewiesen, dass die Ca^{2+} -ATPase aus Schistosomen in transgenen Hefen, in denen dieses Gen ausgeschaltet wurde, die Funktion der hefeeigenen ATPase ersetzen kann (Talla et al., 1998). Durch *RNA interference* (RNAi) (Fire et al., 1998) wurde eine vorübergehende Blockierung der Genexpression eines Glukose-Transporters und der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Skelly et al., 2003) und des Cathepsin B (Boyle et al., 2003) in *S. mansoni* erreicht.

In diesen Studien wird die Expression schistosomaler Gene *in vitro* bzw. nur in einzelnen Stadien untersucht. Eine Aussage darüber, welche Bedeutung diese Gene im gesamten Lebenszyklus spielen, lässt sich daher durch diese Untersuchungen nicht machen (Fan et al., 1998; Franco et al., 1997). Deswegen ist die Entwicklung

eines Transfektionssystems, mit dem transgene Wurmlinien hergestellt werden können, notwendig. Die Entwicklung eines solchen Transfektionssystems ist auf Grund des komplexen Lebenszyklus schwierig (Franco et al., 2000).

Für Schistosomen gibt es keine kontinuierliche Zelllinie. Bislang ist die primäre Zellkultur von schistosomalen Zellen, die aus Sporozysten (Bayne et al., 1994) und aus adulten Würmern (Hobbs et al., 1993) isoliert wurden, beschrieben.

Adulte Würmer produzieren *in vitro* infertile Eier (Basch, 1981). Für die Kultur von *S. japonicum* sind die Aminosäuren Arginin und Glutamin notwendig (Kawanaka et al., 1986). Um die in den Schnecken lebenden Stadien kontinuierlich zu halten, wird eine Schneckenzelllinie aus *Biomphalaria*-Embryonen (*Bge*-Zelllinie) benötigt (Hansen et al., 1974). In Kokultur mit *Bge*-Zellen gelingt die Kultur von Tochttersporozysten, die sich *in vitro* aus Muttersporozysten (Coustau und Yoshino, 2000; Coustau et al., 1997; Hansen et al., 1975) entwickeln. Die Entwicklung von Zerkarien aus Muttersporozysten dauert *in vitro* mehrere Monate und ist als Standardmethode zur Produktion von Zerkarien nicht geeignet (Ivanchenko et al., 1999). Die axenische Kultur von Sporozysten unter geringen Sauerstoffkonzentrationen ist bislang nur in einem Labor gelungen (Bixler et al., 2001). Durch die eingeschränkten Kulturmöglichkeiten von *S. mansoni* kann nicht jedes Stadiums transfiziert werden und die Beschaffung von biologischem Material ist eingeschränkt (Franco et al., 2000).

Viele Standardmethoden zur Transfektion von Parasiten sind bislang für einzellige Apikomplexa entwickelt worden (Okuno et al., 2003; Kocken et al., 2002; Adamson et al., 2001). Im Gegensatz dazu gibt es erst wenige Ansätze Helminthen zu transfizieren. Lediglich der nicht-parasitische frei lebende Nematode *C. elegans* wird bislang standardmäßig zur Herstellung von transgenen Linien transfiziert (Brooks und Isaac, 2002; Hashmi et al., 2001; Praitis et al., 2001). Bis 2000, dem Beginn dieser Arbeit, gab es nur eine Studie zur Transfektion von parasitischen Trematoden (Davis et al., 1999). In einer neuen Studie, die parallel zu dieser Arbeit durchgeführt wurde, konnte eine transiente GFP-Expression in adulten und larvalen Schistosomen nachgewiesen werden. Bei diesen Versuchen wurde ein für die Expression in Pflanzen optimiertes GFP unter der Kontrolle der schistosomalen Promotoren für das 70 kDa-Hitzeschockprotein (HSP70) (Wippersteg et al., 2002 a und 2002 b) und das

Calcineurin (Rossi et al., 2003) eingesetzt. Die transiente Expression in den Schistosomen erwies sich als schwach, daher konnte großflächige GFP-Fluoreszenz nur durch Einsatz eines Laserscanningmikroskopes in 1 % der adulten Würmer nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung Wippersteg).

Um dagegen eine stabile Transfektion von *S. mansoni* zu erreichen, ist es notwendig totipotente Zellen des Parasiten zu transfizieren. Dazu eignen sich Mirazidien oder Sporozysten, die im Inneren mit Keimballen aus undifferenzierten, diploiden Zellen angefüllt sind. Zudem muss der Lebenszyklus mit einem transgenen Stadium komplettiert werden, um von dem *in vitro*-Ansatz ausgehend die heterologe Expression von Genen *in vivo* untersuchen zu können. Bislang ist die Implantation von Tochttersporozysten in die Zwischenwirtsschnecke beschrieben worden (Jourdane et al., 1985), außerdem wurden adulte Würmer in das Pfortadersystem von Mäusen implantiert (Cheever et al., 1994; Basch und Humbert, 1981). Von den zu transfizierenden Zellen hängt schließlich auch die Methode ab, mit der die DNA oder RNA eingebracht wird: Für die Untersuchung zur RNAi wurden Mirazidien und Zerkarien durch Baden in einer Lösung mit doppelsträngiger RNA transfiziert (Skelly et al., 2003; Boyle et al., 2003). In den bereits erwähnten Studien zur transienten Transfektion von Schistosomen wurde Plasmid-DNA durch Mikroprojektilbeschuss eingebracht (Rossi et al., 2003; Wippersteg et al., 2002 a und 2002 b; Davis et al., 1999). Bei dieser Methode werden Nukleinsäuren auf Goldpartikel präzipitiert und in den Zielorganismus durch Heliumdruck hineingeschossen (Taylor und Fauquet, 2002; Davidson, 2000). Eine weitere Möglichkeit zur Transfektion ist der Einsatz der Elektroporation. Durch Elektroporation werden einzellige Organismen wie Bakterien und Protozoen, aber auch *Drosophila*-, Zebrafisch- und Hühnerembryonen erfolgreich transfiziert (Gehl et al., 2003; Ogura, 2002). Die Mikroinjektion wird vor allem zur Transfektion von größeren vielzelligen Organismen eingesetzt, z.B. von *Xenopus*- und Zebrafischembryonen (Lohr und Yost, 2000), von *Drosophila*-Embryonen (O'Connor und Chia, 2002) und von *C. elegans* (Brooks und Isaac, 2002; Hashmi et al., 2001), weil DNA gezielt in einzelne Zellen injiziert werden kann.

Für die Expression der Reporter, die als Transfektionsmarker eingesetzt werden, sind gewebespezifische stark exprimierende Promotoren notwendig (Ogura et al., 2002). Diese Voraussetzung ist bei Schistosomen nicht einfach zu erfüllen, da es auf

Grund des komplexen Lebenszyklus außer einer gewebespezifischen Regulation z.B. von Proteasen (Brindley et al., 1997), eine geschlechtsspezifische Regulation (Prugnolle et al., 2003; Prugnolle et al., 2002; Hoffmann et al., 2002) und eine stadienspezifische Regulation (Franco et al., 1997; Fan et al., 1998) gibt. Da sich die Untersuchung des Genoms der Schistosomen bislang hauptsächlich auf ESTs beschränkt (Dias-Neto et al., 2000), sind nur die schistosomalen Promotoren für das Calreticulin (CAL) (Khalife et al., 1995), die 28 kDa-Glutathion-S-Transferase (GST28) (Serra et al., 1997 und 1996; Zemzoumi et al., 1995) und das 70 kDa-Hitzeschockprotein (HSP70) (Levy-Holtzman und Schechter, 1995 und 1996) in Promotorstudien genau charakterisiert worden. Der spliced leader (SL) RNA-Promotor wurde von Davis et al. (1999) zur Transfektion von adulten Würmern eingesetzt.

Luciferase eignet sich als sensitiver Marker in einem Proteingestamtextrakt, ermöglicht aber keinen Nachweis im lebendigen Organismus. Ein geeigneter Reporter für *in vivo* Untersuchungen ist GFP, das für die Ausbildung des Fluorophors keine Kofaktoren benötigt. Seine Ausbildung ist daher nicht auf die Zellen von Cnidariern beschränkt, aus denen es ursprünglich isoliert wurde (Prasher et al., 1995). Die Notwendigkeit von Sauerstoff für die Ausbildung des Fluorophors beschränkt den Einsatz von GFP auf aerobe Organismen (Ormö et al., 1996; Yang et al., 1996; Cubitt et al., 1995). Als Reportergen, das auch anaerob exprimiert wird, eignet sich β -Galaktosidase, die sich im Unterschied zu Luciferase auch histologisch in Geweben nachweisen lässt (Jackstadt et al., 1999; Fire, 1992).

1.6 Stabile Transfektion mit Hilfe von mobilen genetischen Elementen

Die mobilen genetischen Elemente (MGEs) werden in zwei Hauptkategorien zusammengefasst: MGEs der Klasse I transponieren über ein RNA-Intermediat, wohingegen MGEs der Klasse II direkt als DNA im Genom aktiv sind (Brindley et al., 2003). MGEs spielen eine wichtige Rolle in der Evolution eukaryotischer Genome (Malik und Eickbush, 2001; Charlesworth et al., 1994; Smit, 1993) und beeinflussen die Genomgröße (Petrov et al., 2000). Das schistosomale Genom enthält 60 % an repetitiven Elementen (Simpson et al., 1984). Im schistosomalen Genom wurden *short interspersed nuclear elements* (SINE) ähnliche Retrotransposons (Drew und Brindley, 1995; Spotila et al. 1989) und zwei Familien an Nicht-LTR

Retrotransposons (Laha et al., 2002 a und 2002 b) beschrieben. Im Genom von *S. japonicum* wurde das LTR-Retrotransposon *Gulliver* entdeckt (Laha et al., 2001). Ivanchenko et al. (1999) wiesen mRNA-Transkripte einer reversen Transkriptase und einer Endonuklease in Schistosomen nach, was bedeutet, dass möglicherweise einige MGEs im schistosomalen Genom aktiv sind (Copeland et al., 2003). Für ein nicht-LTR Retrotransposon und für *Gulliver* in *S. japonicum* wurde eine Transkription tatsächlich nachgewiesen (Laha et al. 2002 a; Laha et al., 2001). Auch in dem Plathelminthen *Clonorchis sinensis* wurde die Transkription eines LTR-Retrotransposons beschrieben (Bae et al., 2001). *Boudicca* ist das erste LTR-Retrotransposon aus *S. mansoni*, das vollständig sequenziert wurde (Copeland et al., 2003). Es ist im Aufbau dem Retrotransposon *gypsi* ähnlich (Pantazidis et al., 1999). DNA-Transposons wurden in Schistosomen bislang nicht nachgewiesen. Lediglich in anderen Plathelminthen findet man DNA-Transposons (Arkhipova und Meselson, 2000; Robertson, 1997). In *Dugesia* wurde ein mariner-Transposon entdeckt (Garcia-Fernandez et al., 1995).

MGEs können für die genetische Transformation eingesetzt werden (Brindley et al., 2003; O'Brochta und Atkinson, 1996). Insbesondere Transposons (MGEs der Gruppe II) der *mariner/TC1*-Superfamilie bewegen sich weitgehend unabhängig von Wirtszellfaktoren und sind daher in den Genomen sehr verschiedener Spezies aktiv (Plasterk et al., 1999). Das Transposon *mariner/mos1* aus *Drosophila mauritana* wurde zur Transfektion von *Leishmania* (Gueiros-Filho und Beverley, 1997), von *Plasmodium* (Mamoun et al., 2000), von *Aedes* (Coates et al., 1998), *Bombyx* (Wang et al., 2000) und *C. elegans* (Bessereau et al., 2001) eingesetzt. Es wurde zwar bislang kein DNA-Transposons in Schistosomen gefunden, der Nachweis eines *mariner*-Transposons in dem Plathelminthen *Dugesia* (Garcia-Fernandez et al., 1995) ist aber ein Hinweis darauf, dass *mariner*-Transposons möglicherweise auch im Genom von Schistosomen aktiv sind und daher für eine stabile Transfektion dieses Parasiten eingesetzt werden könnten (Brindley et al., 2003).

Aber auch MGEs der Gruppe I werden für Transfektionen eingesetzt (Miller und Rosman, 1989). Retroviren und Retroelemente besitzen eine stärkere Wirtsspezifität als DNA-Transposons, deswegen ist der Einsatz eines endogenen Retroelementes für die stabile Transfektion besonders interessant, obgleich die Wirtsspezifität durch

Pseudotypisierung mit dem *envelope*-Glykoprotein des *vesicular stomatitis*-Virus (Burns et al., 1993) erweitert werden kann. Sogar die gerichtete Integration in bestimmte Gene ist möglich (Sandmeyer, 2003). Die vorliegende *Boudicca*-Sequenz enthält Mutationen (Copeland et al., 2003). Damit *Boudicca* als molekularbiologisches Werkzeug zur Transfektion eingesetzt werden kann, müsste dieses Retroelement aus *S. mansoni* durch Mutagenese reaktiviert werden. Inaktive DNA-Transposons wurden bereits durch Mutagenese reaktiviert (Plasterk et al., 1999; Robertson und Lampe, 1995).

1.7 Ziele dieser Arbeit

1. Herstellung von Plasmiden zur transienten Transfektion von *S. mansoni* unter Verwendung des CAL-, des GST28- und des HSP70-Promotors und unter Verwendung von EGFP und β -Galaktosidase als Reporter
2. Überprüfung der Funktionalität und Quantifizierung der Promotorstärke in der Zellkultur
3. Entwicklung eines Transfektionssystems für *S. mansoni* unter Verwendung von Mikroinjektion, Elektroporation und Mikroprojektilbeschuss
4. Nachweis der Reportergenaktivität in *S. mansoni*
5. Klonierung der nicht translatierten 5'-Regionen (5'-UTRs) des Cathepsin D und eines Aktins als potentielle Promotoren für die Transfektion
6. Einschleusen eines transgenen Stadiums in den Zyklus
7. Charakterisierung des endogenen Retroelementes *Boudicca* für eine stabile Transfektion von *S. mansoni*: Untersuchungen seiner Transkription in den verschiedenen Stadien und Rekonstruktion der vollständigen Kopie durch Klonierung eines vollständigen Transkript

2 Ergebnisse

2.1 Herstellung von Vektoren zur Expression von EGFP und β -Galaktosidase unter der Kontrolle schistosomaler Promotoren

2.1.1 Isolation des CAL-, des GST28- und des HSP70-Promotors aus genomischer DNA

Der CAL-, der GST28- und der HSP70-Promotor sind die einzigen schistosomalen Promotoren, für die Promotorstudien durchgeführt worden sind. Um sie aus genomischer DNA zu isolieren, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als präparative Methode eingesetzt (Tab. 2.1).

Tab. 2.1: Polymerase-Kettenreaktion zur Isolation schistosomaler Promotoren aus genomischer DNA

Promotor	Primer	Größe des erwarteten Fragmentes	Zugangs-nummer	Referenz
CAL	Cal-for; Cal-rev	623 bp	L24159	Khalife et al., 1993
GST28	Gst-for; Gst-rev	337 bp	M98271	McNair et al., 1993
HSP70	Hsp-for; Hsp-rev	532 bp	L02415	Neumann et al., 1992

Die eingesetzten Primer ermöglichten jeweils die Amplifikation der gesamten Sequenzen der 5'-UTRs. Die amplifizierten Fragmente wiesen die richtigen Größen auf (Abb. 2.1)

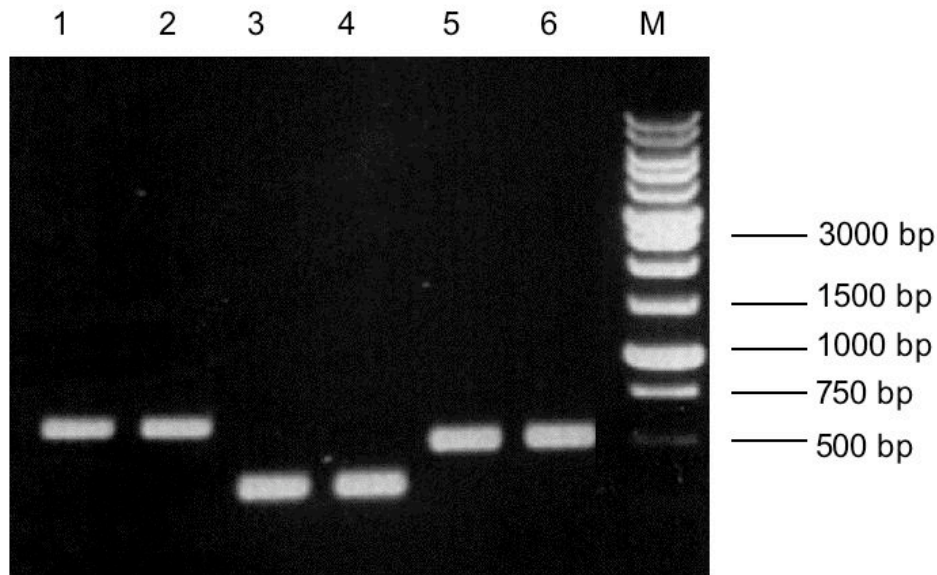


Abb. 2.1: Isolation der schistosomalen Promotoren aus genomischer DNA. Spur 1 und 2: Amplifikation der 623 bp umfassenden 5'-UTR des Cal-Gens mit den Primern Cal-for und Cal-rev. Spur 3 und 4: Amplifikation der 337 bp umfassenden 5'-UTR des GST28-Gens mit den Primern GST-for und GST-rev. Spur 5 und 6: Amplifikation der 532 bp umfassenden 5'-UTR des HSP70-Gens mit den Primern HSP-for und HSP-rev. M ist der Marker.

2.1.2 Subklonierung der Promotoren und Sequenzierung

Zur Subklonierung in das Plasmid pBluescript SK+ (pBSK) war mit den Vorwärtsprimern Cal-for und GST-for am 5'-Ende der entsprechenden Amplikons eine Restriktionsschnittstelle für *EcoR* I eingefügt worden. HSP-for amplifiziert eine am 5'-Ende vorhandene endogene *EcoR* I-Schnittstelle. Die Rückwärtsprimer Cal-Rev, GST-rev und HSP-rev fügten am 3'-Ende der PCR-Produkte eine *Hind* III-Schnittstelle ein. Nach Aufreinigung der Promotorfragmente und Restriktion mit *EcoR* I und *Hind* III wurden sie in den entsprechend geschnittenen pBSK ligiert. Die Sequenzanalyse der in pBSK subklonierten Promotorsequenzen ergab für den Cal-Promotor ein zusätzliches T in Position 116, einen Basenaustausch von G gegen

A in Position 307 und einen Basenaustausch von G gegen A in Position 410. Der klonierte GST-Promotor wies eine Deletion von C in Position 69 auf und der HSP-Promotor zeigte keine Unterschiede zu der veröffentlichten Sequenz. Diese Mutationen liegen alle außerhalb der regulatorischen Bereiche der Promotoren (siehe Anhang I).

2.1.3 Herstellung von promotorlosen Kontrollplasmiden

Um die Aktivität der Promotoren eindeutig nachweisen zu können, wurden Kontrollplasmide, die kodierende Sequenzen für die Reportergene EGFP und β -Galaktosidase, aber keinen Promotor zu ihrer Expression enthielten, hergestellt. Der Reporter EGFP lag in dem Plasmid pEGFP-N1 vor. Dieser Vektor ermöglicht die Expression von EGFP unter dem Cytomegalievirus-Promotor (CMV-Promotor). Zur Eliminierung des Promotors wurde pEGFP-N1 mit den Restriktionsendonukleasen *Ase* I und *Xho* I verdaut, der Restriktionsansatz auf einem Agarosegel aufgetrennt und das Plasmidgerüst ohne den CMV-Promotor aufgereinigt. Durch Auffüllen der überhängenden 5'-Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I und anschließende Ligation wurde das promotorlose Plasmid pEGFP-oP mit EGFP kodierender Sequenz hergestellt. Das Fehlen des Promotors wurde durch Sequenzierung nachgewiesen (siehe Anhang I). Um ein promotorloses Plasmid mit β -Galaktosidase kodierender Sequenz herzustellen, wurde die kodierende Sequenz für EGFP aus pEGFP-oP mit den Restriktionsendonukleasen *Sma* I und *Not* I ausgeschnitten und gegen die kodierende Sequenz für die β -Galaktosidase ausgetauscht, das Plasmid wurde p β -Gal-oP genannt.

2.1.4 Herstellung von Plasmiden zur Expression von EGFP und β -Galaktosidase

Die in pBSK subklonierten schistosomalen Promotoren wurden durch Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*R I und *Kpn* I, Auftrennung auf einem Agarosegel und anschließender Aufreinigung gewonnen und in das entsprechend geschnittene Plasmid pEGFP-oP ligiert (Tab. 2.2) (siehe Anhang II).

Die Herstellung von Plasmiden zur Expression von β -Galaktosidase unter der Kontrolle schistosomaler Promotoren erfolgte durch Austausch der EGFP-kodierenden Sequenz gegen die β -Galaktosidase-kodierende Sequenz (siehe 2.1.3).

Tab. 2.2: Übersicht 1 über die hergestellten Plasmide zur Expression von Reportern unter der Kontrolle schistosomaler Promotoren und die Kontrollplasmide.

Plasmid	Reporter	Promotor
pEGFP-oP	EGFP	ohne
pEGFP-C	EGFP	CAL
pEGFP-G	EGFP	GST28
pEGFP-H	EGFP	HSP70
p β -Gal-CMV	β -Galaktosidase	CMV
p β -Gal-oP	β -Galaktosidase	ohne
p β -Gal-C	β -Galaktosidase	CAL
p β -Gal-G	β -Galaktosidase	GST28
p β -Gal-H	β -Galaktosidase	HSP70

Als Positivkontrolle zur Überprüfung der EGFP-Expression wurde das Ursprungsplasmid pEGFP-N1 eingesetzt. Ein entsprechendes Plasmid zur Überprüfung der β -Galaktosidase-Aktivität wurde durch Austausch der EGFP kodierenden Sequenz in pEGFP-N1 gegen die β -Galaktosidase kodierende Sequenz hergestellt (siehe 2.1.3), das gewonnene Plasmid p β -Gal-CMV exprimiert β -Galaktosidase unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

2.1.5 Überprüfung der Expression von EGFP und β -Galaktosidase in *cos7*-Zellen

Die Funktionalität der hergestellten Plasmide wurde in *cos7*-Zellen nachgewiesen (Levy-Holtzmann et al., 1995). 48 h nach der Transfektion durch Elektroporation wurde die EGFP-Expression fluoreszenzmikroskopisch in lebenden Zellen untersucht. Die Negativkontrolle wurde durch Zellen repräsentiert, die mit dem promotorlosen Plasmid pEGFP-oP transfiziert wurden. Sie wiesen keine Fluoreszenz auf. Als Positivkontrolle dienten mit pEGFP-N1 transfizierte Zellen, hier wiesen 2,5 % der Zellen grüne EGFP-Fluoreszenz auf (Abb. 2.2 a) Auch der Cal-Promotor (Abb. 2.2 b), der GST28-Promotor (Abb. 2.2 c) und der HSP70-Promotor (Abb. 2.2 d) exprimierten EGFP in *cos7*-Zellen, hier betrug der Anteil an grün fluoreszierenden Zellen 0,25-0,5 %; die Fluoreszenz war deutlich schwächer als bei der Positivkontrolle; zur Induktion des HSP70-Promotors war kein Hitzeschock nötig.

Die β -Galaktosidase-Expression wurde 48 h nach der Transfektion in Paraformaldehyd-fixierten Zellen mit Hilfe einer Farbreaktion nachgewiesen. In mit dem promotorlosen Plasmid p β -Gal-oP transfizierten Zellen konnte keine Färbung beobachtet werden, im Unterschied dazu wiesen 3 % der Zellen der Positivkontrolle, die mit p β -Gal-CMV transfiziert waren, eine starke Färbung auf (Abb. 2.3 a). Die Expression unter der Kontrolle der schistosomalen Promotoren war wiederum deutlich schwächer, hier lag die Transfektionsrate bei 0,5 %, β -Galaktosidase wurde unter der Kontrolle des Cal-Promotors (Abb. 2.3 b), des GST28-Promotors (Abb. 2.3 c) und des HSP70-Promotors (Abb. 2.3 d) in *cos7*-Zellen nachgewiesen.

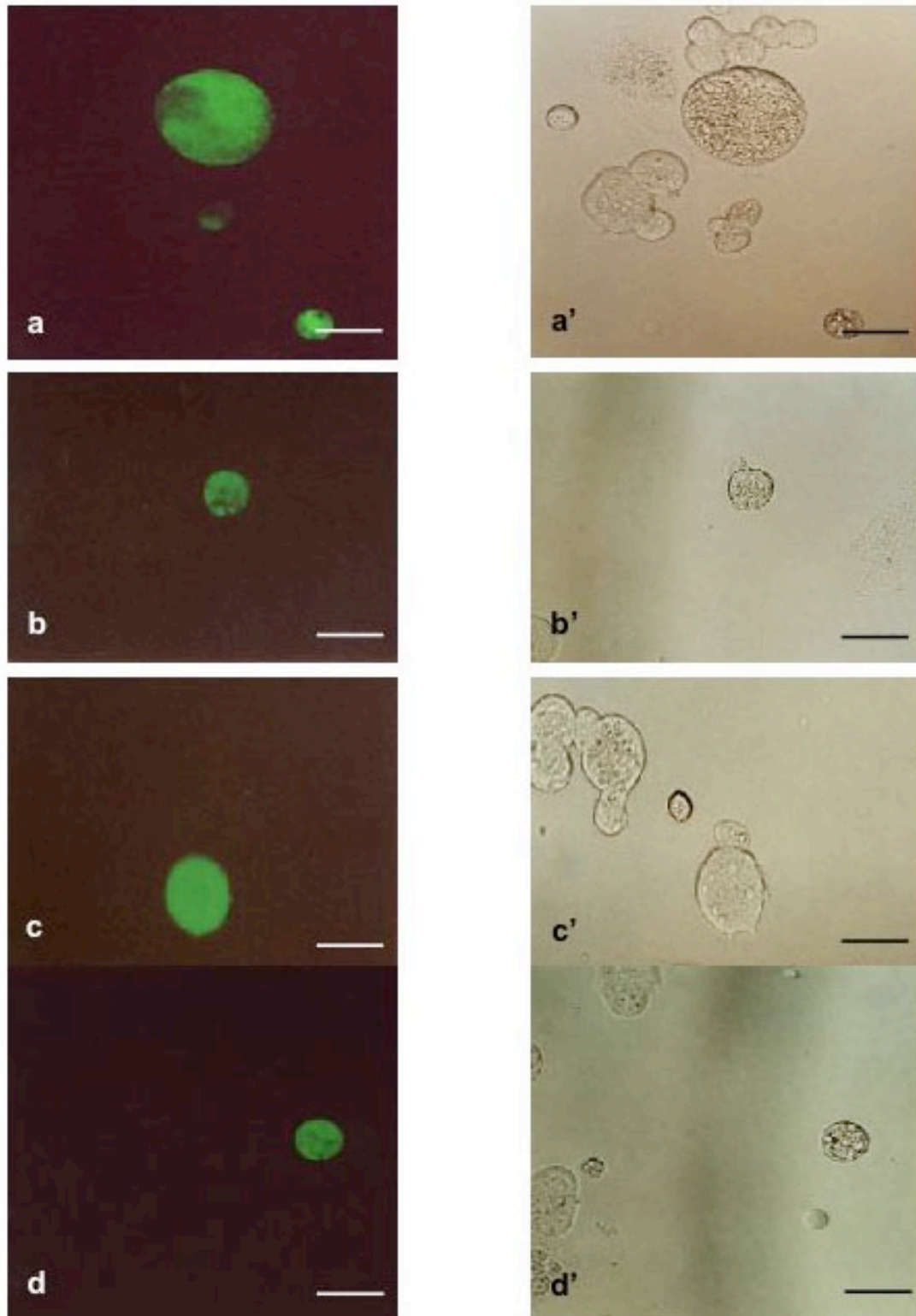


Abb. 2.2: EGFP-Expression in cos7-Zellen unter der Kontrolle schistosomaler Promotoren. a: Positivkontrolle: mit pEGFP-N1 transfizierte Zellen; a': zu a korrespondierende Durchlichtaufnahme. b: mit pEGFP-C transfizierte Zellen; b' zu b korrespondierende Durchlichtaufnahme. c: mit pEGFP-G transfizierte Zellen; c' zu c korrespondierende Durchlichtaufnahme. d mit pEGFP-H transfizierte Zellen; d' zu d korrespondierende Durchlichtaufnahme. Größenbalken 50 μ m.

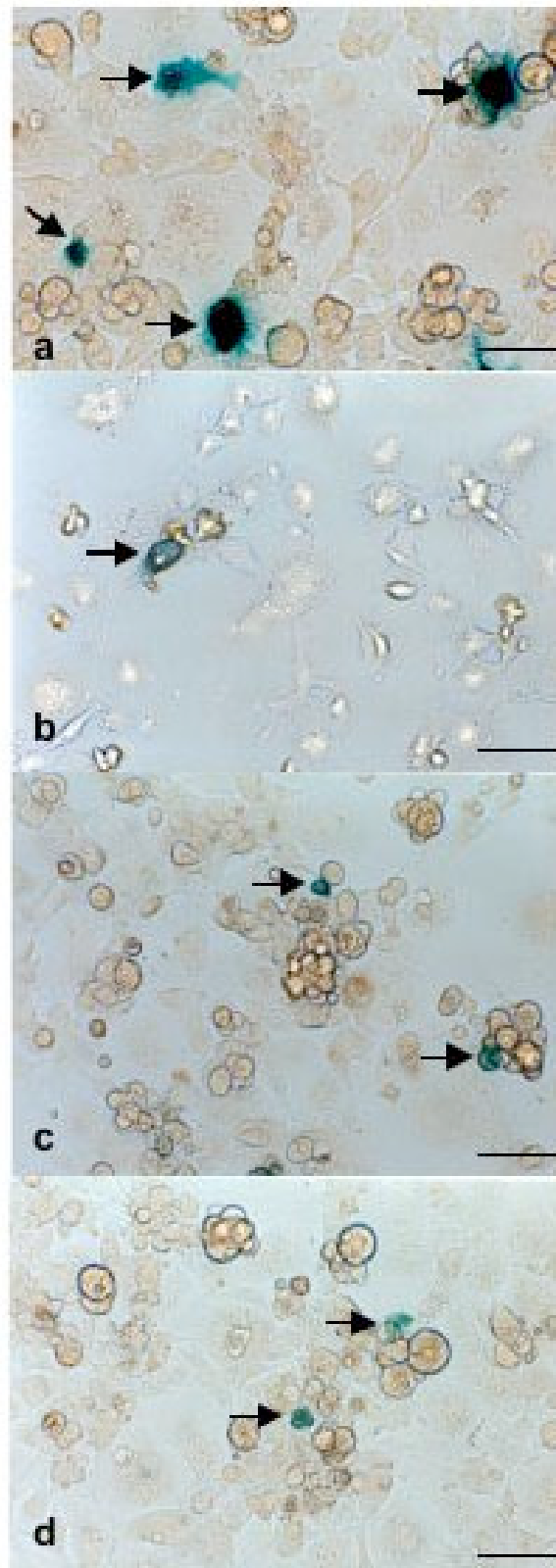


Abb. 2.3: β -Galaktosidase-Expression in cos7-Zellen unter der Kontrolle schistosomaler Promotoren. a: Positivkontrolle: mit p β -Gal-CMV transfizierte Zellen. b: mit p β -Gal-C transfizierte Zellen. c: mit p β -Gal-G transfizierte Zellen. d: mit p β -Gal-H transfizierte Zellen. Größenbalken 150 μ m.

2.1.6 Endogene β -Galaktosidase-Aktivität in *S. mansoni*

Um zu überprüfen, ob sich die β -Galaktosidase als Reporter in transgenen Schistosomen eignet, wurde ihre endogene Aktivität in unbehandelten Würmern überprüft. Die Bestimmung der β -Galaktosidase erfolgte colorimetrisch, wobei gleiche Proteinmengen eines Proteingestamtextraktes weiblicher und männlicher Würmer eingesetzt wurden. Als Positivkontrolle diente eine *E.coli*-Kultur, die β -Galaktosidase exprimiert, als Negativkontrolle diente eine *E.coli*-Kultur, die β -Galaktosidase nicht exprimiert. Es stellte sich heraus, dass adulte Würmer eine endogene β -Galaktosidase-Aktivität aufweisen, wobei die gemessene endogene β -Galaktosidase in weiblichen Würmern bei gleichen Proteinmengen doppelt so stark wie in männlichen Würmern (Abb. 2.4) war. Da eine hohe endogene Aktivität die Verwendbarkeit der β -Galaktosidase als Reporter in Transfektionsversuchen einschränkt, wurden in den Transfektionsversuchen mit β -Galaktosidase nur Männchen eingesetzt.

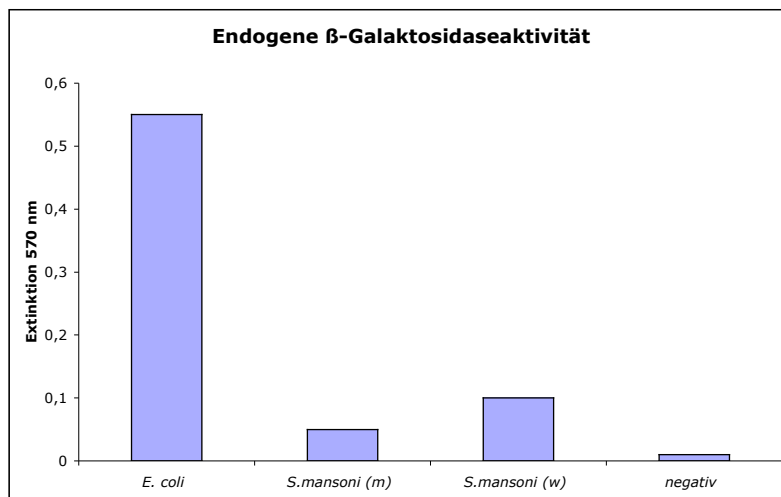


Abb. 2.4: Endogene β -Galaktosidase-Aktivität in adulten *S. mansoni*. Es wurden keine Werte für die spezifische Aktivität bestimmt: Dennoch zeigt sich, dass die Weibchen eine stärkere endogene β -Galaktosidase-Aktivität aufweisen als die Männchen. Dargestellt sind die Werte für die Extinktion bei 570 nm, für die Messung wurden gleiche Proteinmengen eingesetzt.

2.1.7 Ermittlung der Promotorstärke in der Zellkultur

Bisher wurde gezeigt, dass die hergestellten Plasmide EGFP und β -Galaktosidase in *cos7*-Zellen exprimieren. Um die Stärke der Expression durch die verschiedenen Promotoren zu quantifizieren, wurde die β -Galaktosidase-Aktivität in transient transfizierten Zellpopulationen mit Hilfe eines kommerziellen Tests 48 h nach der Transfektion colorimetrisch bestimmt und daraus die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität nach Angaben des Herstellers ermittelt (Abb. 2.5). Als Negativkontrolle wurden Zellen mit dem promotorlosen Plasmid p β -Gal-oP transfiziert, hier lag die spezifische Aktivität der β -Galaktosidase bei 0,35 U/mg Gesamtprotein. Die Aktivität der β -Galaktosidase bei der Expression der β -Galaktosidase unter der Kontrolle des CAL-Promotors betrug 0,49 U/mg Gesamtprotein, das entspricht einer Steigerung von 40 % gegenüber der Negativkontrolle ($p < 0,0001$).

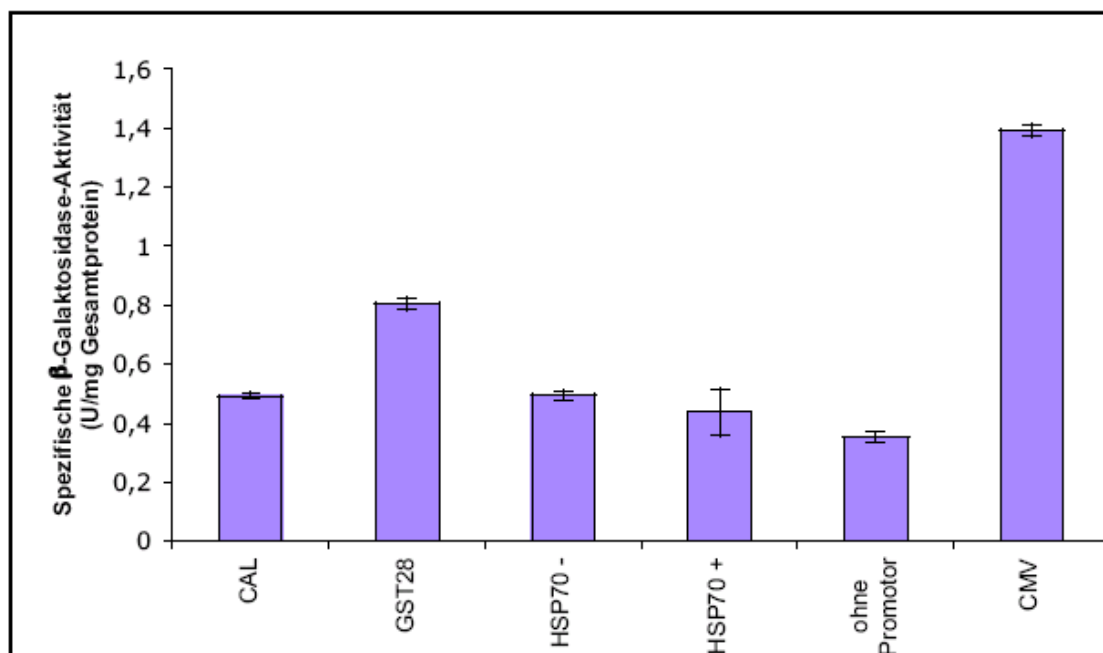


Abb. 2.5: Ermittlung der Stärke schistosomaler Promotoren durch Messung der spezifischen β -Galaktosidase-Aktivität in *cos7*-Zellen. Als Negativkontrolle diente eine Zellpopulation, die mit dem promotorlosen Plasmid transfiziert wurde, Positivkontrolle ist eine Zellpopulation, in der β -Galaktosidase unter dem CMV-Promotor exprimiert wird. Der GST28-Promotor erwies sich in der Zellkultur als stärkster Promotor. Ein Hitzeschock hat keinen Einfluss auf die Expression unter der Kontrolle des HSP70-Promotors in dem Plasmid p β -Gal-H (HSP70+ mit Hitzeschock; HSP70- ohne Hitzeschock). Dargestellt sind die Mittelwerte inkl. Standardabweichung, die aus den Vierfachbestimmungen berechnet wurden.

Um den Einfluss eines Hitzeschocks auf die Expression von β -Galaktosidase unter der Kontrolle des HSP70-Promotors zu untersuchen, wurden mit dem Plasmid p β -Gal-H transfizierte Zellen mit und ohne Hitzeschock kultiviert (siehe 5.1.4.1.4). Der Hitzeschock führte zu keiner Erhöhung der Expression an β -Galaktosidase durch das Plasmid p β -Gal-H. Die Aktivität der β -Galaktosidase in nicht hitzegeschockten Zellen betrug 0,49 U/mg Gesamtprotein, was einer Steigerung 40,0 % gegenüber der Negativkontrolle entspricht ($p < 0,0001$), in den hitzegeschockten Zellen betrug die spezifische Aktivität 0,44 U/mg Gesamtprotein, was eine Steigerung von 25,7 % gegenüber der Negativkontrolle bedeutet ($p = 0,04$). Der stärkste schistosomale Promotor in der Zellkultur war der GST28-Promotor mit einer spezifischen Aktivität von 0,8 U/mg Gesamtprotein, die Aktivität der β -Galaktosidase war in mit dem Plasmid p β -Gal-G transfizierten Zellen um 128,6 % gegenüber der Negativkontrolle gesteigert ($p < 0,0001$). Die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität in der Positivkontrolle betrug 1,39 U/mg Gesamtprotein und war damit um 297,1 % gegenüber der Negativkontrolle gesteigert ($p < 0,0001$).

2.1.8 Herstellung eines durch Hitzeschock aktivierbaren Plasmids zur Expression von EGFP

Weil sich die Plasmide pEGFP-H und p β -Gal-H, die beide den HSP70-Promotor enthalten, nicht durch einen Hitzeschock induzieren ließen (siehe 2.1.5 und 2.1.7), wurde ein weiteres Plasmid zur transienten Expression von EGFP auf Grundlage der in der Genbank unter der Zugangsnummer L02415 veröffentlichten Sequenz des schistosomalen HSP70-Gens hergestellt.

Zur Isolation der 5'-UTR und der 3'-UTR des HSP70-Gens aus genomischer DNA wurde wiederum die PCR als präparative Methode eingesetzt. Die EGFP kodierende Sequenz wurde aus pEGFP-N1 ausgeschnitten und über ein Agarosegel aufgereinigt (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Fragmente zur Herstellung eines Konstruktes zur Expression von EGFP unter den nativen Bedingungen des HSP70-Gens

Fragment	Primer	Größe des erwarteten Fragmentes	Restriktionsschnittstellen
HSP70-5'-UTR	HSP-for; HSP-revBamHI	532 bp	<i>EcoR</i> I; <i>BamH</i> I
HSP70-3'-UTR	HSP3'-for; HSP3'-rev	760 bp	<i>Xba</i> I; <i>Hind</i> III
EGFP	keine	720 bp	<i>BamH</i> I; <i>Xba</i> I

Die drei Fragmente wurden nacheinander in den entsprechend geschnittenen Vektor pUC19 kloniert. Das hergestellte Plasmid pH-EGFP-H exprimiert EGFP unter den natürlichen Bedingungen des HSP70-Gens von *S. mansoni*.

Die Funktionalität dieses neuen Plasmids pH-EGFP-H wurde wiederum in *cos7*-Zellen getestet. Als Negativkontrolle diente das promotorlose Plasmid pEGFP-oP, als Positivkontrolle pEGFP-N1. Mit dem Plasmid pH-EGFP-H transfizierte Zellen wurden mit und ohne Hitzeschock kultiviert (siehe 5.1.4.1.4). Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurde keine EGFP-Fluoreszenz in der nicht hitzegeschockten Zellpopulation festgestellt. Demgegenüber fluoreszierten 0,5 % der hitzegeschockten Zellen (Abb. 2.17 a, S. 58).

2.2 Entwicklung eines Systems zur genetischen Transfektion von *S. mansoni*

Um DNA in die Schistosomen einzubringen, wurden verschiedene Transfektionsmethoden getestet. Entscheidend für die Eignung der Methode war die Möglichkeit ein Stadium zu transfizieren, das in den Lebenszyklus integriert werden kann. Deswegen bezogen sich Transfektionsversuche zunächst auf ein larvales Stadium, die Muttersporozyste, die sich *in vitro* in großen Mengen gewinnen lässt und die durch Implantation in die Zwischenwirtsschnecke in den Zyklus integriert werden sollte.

2.2.1 Mikroinjektion

Mit Hilfe der Mikroinjektion wurde versucht, DNA direkt in die Keimballen der Muttersporozysten zu injizieren.

Die Mikroinjektion wurde für die Transfektion von Sporozysten angepasst. Die wichtigsten Ansätze zur Optimierung waren die Reduktion des Durchmessers der

Haltenadel auf einen Innendurchmesser von 5-10 μm , um eine große Auflagenfläche für die Sporozysten zu erhalten, und der Einsatz von Sporozysten, die nach 48 h Kultur *in vitro* weniger beweglich waren als Sporozysten direkt nach ihrer Transformation aus Mirazidien.

In Vorversuchen gelang es 0,1 μl Mikroinjektionspuffer in die Sporozysten zu injizieren (Abb. 2.6). Sporozysten wurden durch die Mikroinjektion zwar beschädigt, konnten aber dennoch bis zu einer Woche in Kultur gehalten werden. Der Injektionserfolg wurde auch durch die Injektion von Trypan-Blau mikroskopisch nachgewiesen.

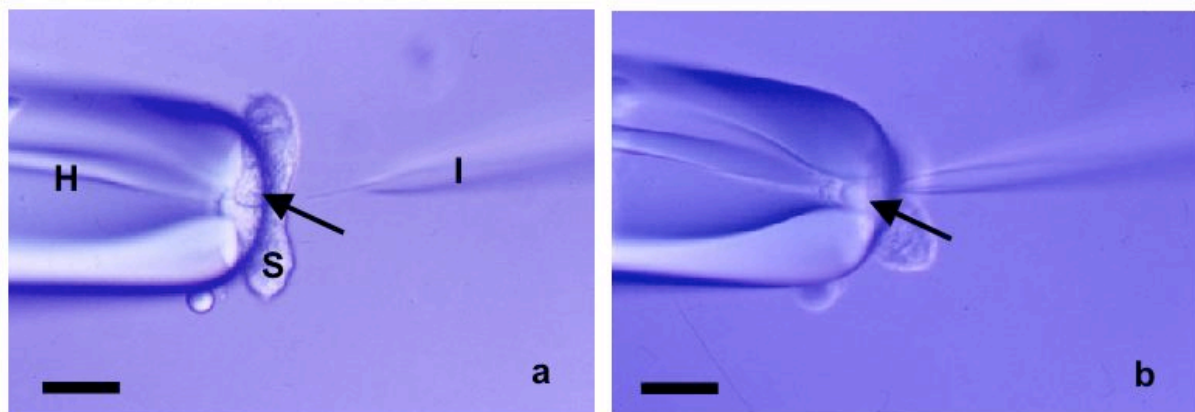


Abb. 2.6: Vorgang der Mikroinjektion einer Muttersporozyste. Die Sporozyste (S) wird von der Haltenadel (H) fixiert, sodass ein Keimballen (Pfeil) in der Öffnung der Haltenadel liegt (a). Mit der Injektionsnadel (I) wird Plasmid-DNA direkt in den Keimballen injiziert (b). Größenbalken 200 μm .

Nach diesen Vorversuchen wurden Sporozysten mit promotorlosem pEGFP-oP und mit pEGFP-G mikroinjiziert. Als weitere Negativkontrolle wurden unbehandelte

Sporozysten kultiviert. Nach 48 h wurde der Transfektionserfolg unter dem Mikroskop untersucht. Beide Gruppen von mikroinjizierten Sporozysten wiesen eine sehr starke endogene Fluoreszenz auf, sodass EGFP-Fluoreszenz nicht zu detektieren war.

Die unbehandelten Sporozysten wiesen im Unterschied dazu geringere Eigenfluoreszenz auf. Offensichtlich wird die endogene unspezifische Fluoreszenz durch den Stress, dem die Sporozysten bei der Mikroinjektion ausgesetzt sind, verstärkt. Insgesamt konnte außerdem nur eine geringe Anzahl von Sporozysten pro Tag mikroinjiziert werden, sodass nicht ausreichend biologisches Material für weitere biochemische und genetische Analysen erzeugt werden konnte.

Die Mikroinjektion wurde daher zur Transfektion von Sporozysten in weiteren Versuchen nicht eingesetzt.

2.2.2 Elektroporation

Die Methode der Elektroporation wird erfolgreich zum Einbringen von DNA und RNA in Bakterien, einzellige Protozoen aber auch multizelluläre Organismen wie *Drosophila*-Embryonen, Zebrafisch-Embryonen oder Hühner-Embryonen eingesetzt (Gehl, 2003).

Zunächst wurden Sporozysten ohne DNA in Anlehnung an diese Protokolle elektroporiert. Die Überlebensrate bei einer Elektroporation mit der Feldstärke von 660 V/cm mit zwei Pulsen von 250 μ s lag bei 80 %; bei der Elektroporation bei einer Feldstärke von 910 V/cm mit einem Puls von 250 μ s lag die Überlebensrate bei 50 %. Auffallend war eine Formveränderung der Sporozysten. Die normalerweise zylinderförmigen Organismen kugelten sich ab. Ihre Vitalität wurde mikroskopisch anhand peristaltischer Bewegungen und schlagender Wimpernzellen in den Protonephridien nachgewiesen. Die unmittelbar nach der Elektroporation zu beobachtenden morphologischen Veränderungen der Sporozysten waren reversibel. Nach 24 h ließen sich elektroporierte Sporozysten nicht mehr von unbehandelten Sporozysten unterscheiden. Die Formveränderungen waren ein Hinweis darauf, dass sich Membraneigenschaften durch das Anlegen des elektrischen Feldes bei der Elektroporation veränderten.

Um die Elektropermeabilisierung der Sporozystenmembran nachzuweisen, wurden Sporozysten in Anwesenheit von Propidiumiodid elektroporiert (Gabriel und Teissie,

1997; Sersa et al., 1995). Sporozysten, die mit Propidiumiodid elektroporiert wurden, wiesen im Unterschied zu Sporozysten, die ohne diesen Farbstoff elektroporiert wurden, oder zu Sporozysten, die mit dem Farbstoff ohne anschließende Elektroporation inkubiert wurden, eine deutliche orange-rote Fluoreszenz in der Oberfläche bei der Anregung mit Licht der Wellenlänge 546 nm (Grünlicht) unter dem Epifluoreszenzmikroskop auf. Da Propidiumiodid nicht durch eine intakte Membran diffundieren kann, ist die Fluoreszenz in den Sporozysten, die nach der Elektroporation zu beobachten ist, ein eindeutiger Hinweis darauf, dass die Sporozystenmembran elektropermeabilisiert wurde.

Für die genetische Transformation wurden Muttersporozysten in Anwesenheit von Plasmid-DNA (pEGFP-H oder pEGFP-G) in einer Konzentration von 20 bis 100 ng / μ l elektroporiert. Sporozysten wiesen nach der Elektroporation starke endogene Fluoreszenz auf, wie sie zuvor bei der Mikroinjektion beobachtet worden war (siehe 2.2.1). Diese Eigenfluoreszenz war in unbehandelten Sporozysten nicht zu beobachten, sie trat aber auch auf, wenn Sporozysten ohne DNA elektroporiert wurden. Das bedeutet, dass der Stress, dem die Sporozysten bei der Elektroporation ausgesetzt sind, die endogene Fluoreszenz verstärkt. Auf Grund der Eigenfluoreszenz konnte keine EGFP-Fluoreszenz detektiert werden. Um die EGFP-Fluoreszenz zu verstärken, wurde versucht, das Eindringen von DNA bei der Elektroporation zu erhöhen. Aber auch bei der Elektroporation in Anwesenheit von DEAE/DEXTRAN (Neumann et al., 1996), konnte mikroskopisch keine EGFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Außerdem erwies sich die Langzeitkultur elektroporierter Sporozysten im Vergleich zu nicht elektroporierten Sporozysten als problematisch. Obgleich 50-80 % der Sporozysten 24 h nach der Elektroporation vital waren und sich nicht von unbehandelten Sporozysten unterschieden, ließen sich elektroporierte Sporozysten maximal 96 h *in vitro* kultivieren. Unbehandelte Sporozysten dagegen waren unter den gleichen Kulturbedingungen bis zu 10 Tagen vital.

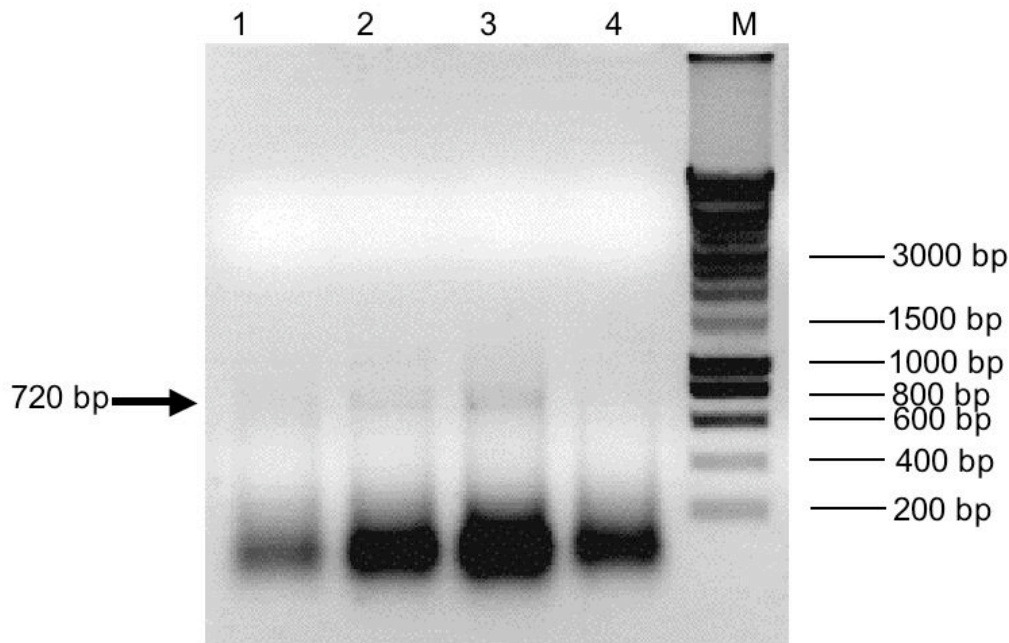


Abb. 2.7: Nachweis der EGFP-Expression in elektroporierten Sporozysten. Spur 1: pEGFP-H: Elektroporation bei 660V/cm und 2 Pulsen; Spur 2: pEGFP-H: Elektroporation bei 910V/cm und 1 Puls; Spur 3: pEGFP-G: Elektroporation bei 660V/cm und 2 Pulsen; Spur 4: Negativkontrolle pEGFP-oP: Elektroporation bei 660 V/cm und 2 Pulsen.

Um die Expression von EGFP molekularbiologisch nachzuweisen, wurde 3 Tage nach der Elektroporation aus elektroporierten Sporozysten die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und auf EGFP-Transkripte untersucht. In mit pEGFP-H und pEGFP-G transfizierten Sporozysten wurden EGFP-Transkripte mit der Größe von 720 bp nachgewiesen (Abb. 2.7).

Die Expression von β -Galaktosidase in fixierten und histologisch gefärbten Sporozysten konnte nicht nachgewiesen werden. Ein Nachweis der β -Galaktosidase durch RT-PCR war auf Grund der endogenen Aktivität dieses Enzyms auch nicht möglich.

Die Ergebnisse zur Transfektion von Sporozysten durch die Elektroporation zeigten, dass die zuvor in Zellkulturzellen *in vitro* getesteten Plasmide (siehe 2.1.5), die EGFP unter der Kontrolle des HSP70 und des GST28-Promotors exprimieren, auch in den Sporozysten EGFP-Expression ermöglichen. Insgesamt aber erwies sich die Elektroporation zur Transfektion von Sporozysten als ungeeignet, da eine Kultur der

elektroporierten Sporozysten, die Voraussetzung für eine Integration in den Zyklus ist, nicht möglich war. Die Elektroporation wurde daher in weiteren Versuchen nicht zur Transfektion von Sporozysten eingesetzt.

2.2.3 Mikroprojektilbeschuss

Der Mikroprojektilbeschuss wird sowohl zur stabilen als auch zur transienten Transfektion in pflanzlichen und tierischen Geweben eingesetzt (Taylor und Fauquet, 2002; Davidson et al., 2000). Bei dieser Methode wird die DNA an Goldpartikel präzipitiert, die dann in den Organismus hineingeschossen werden.

In Vorversuchen wurde nachgewiesen, dass Sporozysten und adulte Würmer nach einer kurzen Inkubation in einem Vakuum von 15 mm Quecksilbersäule, das für den Mikroprojektilbeschuss angelegt werden muss, vital waren. Auch das Entfernen des Kulturmediums und das damit verbundene Trockenfallen der Parasiten für eine kurze Zeit, schränkte ihre Vitalität nicht ein.

Um die Bedingungen zur Transfektion von Sporozysten zu optimieren, wurden anstelle von DNA mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gelabelte Oligonukleotide eingesetzt. FITC fluoresziert bei der Anregung mit Licht der Wellenlänge 490 nm (Blaulicht) gelb-grün bei einer Wellenlänge von 507 nm. Die Spektren für die Absorption und Emission ähneln damit denen des EGFP. Im Unterschied zu EGFP kann die Fluoreszenz direkt beobachtet werden, ohne auf eine Expression warten zu müssen. Zudem verhalten sich die Oligonukleotide beim Beladen der Goldpartikel wie DNA. Die FITC-Fluoreszenz verhält sich daher proportional zu der übertragenen DNA-Menge und der Transfektionsrate. Die FITC-Intensität wird durch einen hohen Heliumdruck beim Beschuss, mit dem tiefere Gewebeschichten in den Sporozysten erreicht werden, durch eine erhöhte Goldmenge, mit der mehr DNA transportiert wird und durch eine größere Oligonukleotid-Menge gesteigert. Die Überlebensrate verhält sich gegenläufig. Um eine hohe Überlebensrate bei einer hohen Transfektionsrate zu ermitteln, wurden Drücke zwischen 900 und 1800 Psi, Goldmengen zwischen 0,6 und 1,2 mg und Oligonukleotid-Mengen zwischen 1 und 10 μ g für den Beschuss von Sporozysten eingesetzt. Standardmäßig wurden Goldpartikel mit einer Größe von 1 μ m eingesetzt. Die höchste Transfektionseffizienz mit einer Überlebensrate von 80 %

der Muttersporozysten wurde durch den Einsatz von 0,6 mg Gold, 5 μ g DNA und einem Druck von 900 Psi für den Beschuss erzielt. Beschossene Sporozysten konnten *in vitro* bis zu 10 Tagen kultiviert werden. Die adulten Würmer erwiesen sich als widerstandsfähiger gegenüber dem Mikroprojektilbeschuss. Um zu gewährleisten, dass möglichst viel DNA in die Würmer übertragen wird, wurden sie bei 1800 Psi zweimal kurz hintereinander mit jeweils 0,6 mg Gold und 5 μ g DNA beschossen.

2.2.3.1 Nachweis der Reportergenaktivität in adulten Würmern und Sporozysten

Die Transfektion von Sporozysten durch Mikroprojektilbeschuss wurde zunächst mit 0,6 mg Gold und 5 μ g bei einem Druck von 1500 Psi durchgeführt. In diesen Versuchen lag die Überlebensrate der Sporozysten bei 10 %. Die Sporozysten wurden nach dem Beschuss bei 28°C kultiviert und nach 48 h epifluoreszenzmikroskopisch, d.h. mit Auflichtfluoreszenz, untersucht. In Sporozysten, in denen EGFP unter der Kontrolle des GST28-Promotors durch das Plasmid pEGFP-G exprimiert wurde, war nach dem Quenchen der Eigenfluoreszenz durch Trypan-Blau (Loike und Silverstein, 1983) in einzelnen Zellen bei einer Anregungswellenlänge von 450-490 nm (Blaulicht) grüne EGFP-Fluoreszenz detektierbar (Abb. 2.8 a). Um nachzuprüfen, ob die beobachtete Fluoreszenz spezifisch für EGFP war, wurde die Fluoreszenz der Sporozysten vergleichend bei Anregung mit einer Wellenlänge von 546 nm (Grünlicht) untersucht. EGFP-Fluoreszenz konnte nicht mehr beobachtet werden (Abb. 2.8 a'). Die beobachtete grüne Fluoreszenz beruht also auf der Expression von EGFP in einzelnen Zellen der Sporozysten. In der Durchlichtaufnahme (Abb. 2.8 a'') ist zu sehen, dass Trypan-Blau, mit dem die endogene Fluoreszenz gequencht wurde, in die Sporozysten eingedrungen war. Trypan-Blau diffundiert nicht durch eine intakte Membran. Die Sporozysten wurden offensichtlich bei dem Beschuss stark beschädigt. Dennoch konnte ihre Vitalität zum Zeitpunkt der mikroskopischen Untersuchung anhand peristaltischer Bewegungen und schlagender Wimpernzellen in den Protonephridien nachgewiesen werden. Einen weiteren Hinweis auf ihre Vitalität liefert die beobachtete Expression des EGFP. Die Negativkontrolle wurde repräsentiert durch Sporozysten, die mit dem promotorlosen Plasmid pEGFP-oP transfiziert worden waren. Grüne EGFP-Fluoreszenz wurde hier nicht detektiert.

In mit p β -Gal-G transfizierten Sporozysten, das die β -Galaktosidase-Expression unter der Kontrolle des GST28-Promotors ermöglicht, wurde 48 h nach dem Mikroprojektilbeschuss die Expression von β -Galaktosidase nachgewiesen. In der entsprechenden Negativkontrolle, die durch Sporozysten repräsentiert wurde, die mit dem promotorlosen Plasmid p β -Gal-oP transfiziert worden waren, konnte keine β -Galaktosidase-Expression festgestellt werden (Tab. 2.4).

In Sporozysten, die mit dem Plasmid pEGFP-H transfiziert wurden, das eine Expression von EGFP unter der Kontrolle des HSP70-Promotors ermöglicht, wurde keine EGFP-Fluoreszenz detektiert. Die Transkription von EGFP durch das Plasmid pH-EGFP-H, in dem die SV40-Polyadenylierungsstelle gegen den endogenen nicht translatierten HSP70-3'-Bereich ausgetauscht war, ließ sich durch eine RT-PCR nachweisen (Tab 2.4). Die Expression von EGFP unter der Kontrolle des CAL-Promotors mit dem Plasmid pEGFP-C konnte nicht gezeigt werden.

Durch Absenken des Druckes auf 900 Psi wurde die Überlebensrate der Sporozysten auf 80 % gesteigert. 48 h nach der Transfektion konnte EGFP-Fluoreszenz in intakten Sporozysten nicht nachgewiesen werden. Mit pEGFP-G transfizierte intakte Sporozysten wiesen unter dem Epifluoreszenzmikroskop punktförmige fluoreszierende Bereiche auf (Abb. 2.8 b) und unterschieden sich nicht von der Negativkontrolle (Abb. 2.8 c), die durch Sporozysten repräsentiert wurde, die mit dem promotorlosen Plasmid transfiziert worden waren. Das Quenchen der Eigenfluoreszenz war in den unversehrten Sporozysten nicht möglich, da Trypan-Blau nicht durch eine intakte Membran diffundieren kann. Auch die Expression von EGFP unter der Kontrolle des HSP70-Promotors mit den Plasmiden pEGFP-H und pH-EGFP-H oder unter der Kontrolle des CAL-Promotors mit dem Plasmid pEGFP-C führte zu keiner detektierbaren Fluoreszenz in intakten Sporozysten.

Da die Würmer widerstandsfähiger gegenüber dem Mikroprojektilbeschuss waren, wurden sie für die Optimierung der Transfektion anstelle von Sporozysten eingesetzt. Adulte Würmer wurden im Unterschied zu den Sporozysten bei einem Druck von 1800 Psi zweimal innerhalb weniger Minuten beschossen. Nach einer 24-stündigen Kultur bei 37°C wurden sie für 4 h bei 42°C hitzegeschockt und dann weitere 24 h bei 37°C kultiviert, bevor sie mikroskopisch untersucht wurden. Auf diese Weise kultivierte mit pH-EGFP-H transfizierte adulte Würmer wiesen bei der

epifluoreszenzmikroskopischen Untersuchung keine sichtbare EGFP-Fluoreszenz (Abb. 2.9 a) im Vergleich zu der Negativkontrolle (Abb. 2.9 b) auf, die durch mit dem promotorlosen Plasmid beschossene Würmer repräsentiert wurde. In der zu Abb. 2.9 a korrespondierenden Durchlichtaufnahme a' sind zahlreiche Goldpartikel zu erkennen. Diese Goldpartikel ließen sich in unterschiedlichen fokalen Ebenen nachweisen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sie in das Gewebe eingedrungen waren. Eine sichtbare Expression von EGFP war mit den Plasmiden pEGFP-H und pEGFP-G allerdings nicht möglich. Um dennoch die Transkription von EGFP molekularbiologisch nachzuweisen, wurde 2 Tage nach der Transfektion aus beschossenen Würmern die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und auf EGFP-Transkripte untersucht. Sowohl in mit pH-EGFP-H als auch in pEGFP-G transfizierten adulten Würmern wurden EGFP-Transkripte mit EGFP-spezifischen Primern nachgewiesen (Abb. 2.9 c). Der Nachweis von EGFP-Transkripten gelang auch in mit pEGFP-H transfizierten Würmern (Tab 2.4). Mit pEGFP-C transfizierte Würmer wiesen keine EGFP-Fluoreszenz auf. Eine Untersuchung auf EGFP-Transkripte wurde hier nicht durchgeführt.

Da die Detektion von EGFP epifluoreszenzmikroskopisch nicht möglich war, aber durch den Nachweis von EGFP-Transkripten die Transkription gezeigt worden war, wurde die Detektion von EGFP durch den Einsatz eines Laserscanning-Mikroskopes optimiert. Durch die Verbesserung der Detektion wurde EGFP bei der Expression unter der Kontrolle des HSP70-Promotors in adulten Würmern nachgewiesen. Ca. 5 % der mit pH-EGFP-H transfizierten Würmer wiesen EGFP-Fluoreszenz auf, die mit einzelnen Goldpartikeln kolokalisierte (Abb. 2.10 a). Diese EGFP-Fluoreszenz war nur unter Blaulicht-Anregung (Abb. 2.10 a), nicht aber unter Grünlicht-Anregung sichtbar (Abb. 2.10 a'). Durch die Überlagerung beider Bilder konnte unspezifische Fluoreszenz, die durch Verletzung des Gewebes auftrat, von spezifischer EGFP-Fluoreszenz unterschieden werden (Abb. 2.10 a'') werden. Die Negativkontrolle wurde durch unbeschossene Würmer, durch Würmer, die mit pH-EGFP-H transfiziert, aber ohne Hitzeschock kultiviert worden waren und durch Würmer, die mit promotorlosem Plasmid pEGFP-oP transfiziert waren, repräsentiert. Hier wurde keine EGFP-Fluoreszenz detektiert. EGFP-Fluoreszenz wurde auch nicht in mit pEGFP-H transfizierten Würmern festgestellt. Eine Expression unter der Kontrolle

des GST28-Promotors durch das Plasmid pEGFP-G oder unter der Kontrolle des CAL-Promotors durch das Plasmid pEGFP-C konnte fluoreszenzmikroskopisch auch nicht durch Einsatz eines Laserscanning-Mikroskopes nachgewiesen werden. In 3 der ca. 300 untersuchten Würmern, die mit pH-EGFP-H beschossen worden waren, kolokalisierte EGFP-Fluoreszenz nicht mit einzelnen Goldpartikeln, sondern trat großflächig auf. Die auftretende EGFP-Fluoreszenz zeigte sich verstärkt im Saugnapf und im posterialen Ende (Abb. 2.10 b). In dem Proteingesamtextrakt aus Würmern, die mit dem gleichen Konstrukt beschossen worden waren, konnte durch Western-Blot-Analyse EGFP dagegen nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis von EGFP in intakten Sporozysten war auch durch den Einsatz eines Laserscanning-Mikroskopes nicht möglich.

Der Einsatz von β -Galaktosidase als Reporter führte zu keiner Verbesserung der Transfektionsergebnisse. In mit p β -Gal -G transfizierten adulten Würmern (Abb. 2.11 a) wurden vergleichbare Regionen unspezifisch angefärbt wie in der Negativkontrolle (Abb. 2.11 b). Goldpartikel und histologische Färbung kolokalisierten nicht.

Zur Überprüfung der Methode, wurden *cos7*-Zellen durch Mikroprojektilbeschuss transfiziert. In mit pH-EGFP-H transfizierten *cos7*-Zellen wurde nach der Induktion des HSP70-Promotors durch einen Hitzeschock EGFP-Fluoreszenz in 3 % der Zellen detektiert. Damit war sicher gestellt, dass tatsächlich DNA beim Mikroprojektilbeschuss übertragen wurde.

Um die Transfektion eines multizellulären Organismus zu überprüfen, wurde *C.elegans* unter den gleichen Bedingungen wie die adulten Schistosomen durch Mikroprojektilbeschuss transfiziert. Für die Transfektion wurde das Plasmid pPD118-20 (Fire-Lab, 1997) eingesetzt. Dieses Plasmid ermöglicht die Expression eines für *C. elegans* optimierten GFPs unter der Kontrolle eines Myosin-Promotors. Nach 48 h konnte GFP in 5 % der Würmer in einzelnen Muskelzellen epifluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 2.12).

Tab.2.4: Übersicht über die Nachweisbarkeit von EGFP und β -Galaktosidase in Sporozysten und adulten Würmern nach der Transfektion mit Konstrukten, die den GST28 - oder den HSP70-Promotor enthalten. Unter der Kontrolle des CAL-Promotors konnte keine Reporterexpression nachgewiesen werden.

Konstrukt	Reporter	Promotor	Polyadenylierung	Stadium	Nachweis
pEGFP-H	EGFP	HSP70	SV40	Sporozyste	RT-PCR
pEGFP-H	EGFP	HSP70	SV40	Adulter Wurm	RT-PCR
pEGFP-G	EGFP	GST28	SV40	Sporozyste	Fluoreszenz RT-PCR
pEGFP-G	EGFP	GST28	SV40	Adulter Wurm	RT-PCR
p β Gal-H	β Gal	HSP70	SV40	Sporozyste	nicht nachweisbar
p β Gal-H	β Gal	HSP70	SV40	Adulter Wurm	nicht nachweisbar
p β Gal-G	β Gal	GST28	SV40	Sporozyste	spezifische Färbung
p β Gal-G	β Gal	GST28	SV40	Adulter Wurm	nicht nachweisbar
pH-EGFP-H	EGFP	HSP70	HSP70	Sporozyste	RT-PCR
pH-EGFP-H	EGFP	HSP70	HSP70	Adulter Wurm	Fluoreszenz RT-PCR
pEGFP-oP	EGFP	ohne Promotor	SV40	Adulter Wurm / Sporozyste	nicht nachweisbar
p β Gal-oP	β Gal	ohne Promotor	SV40	Adulter Wurm / Sporozyste	nicht nachweisbar

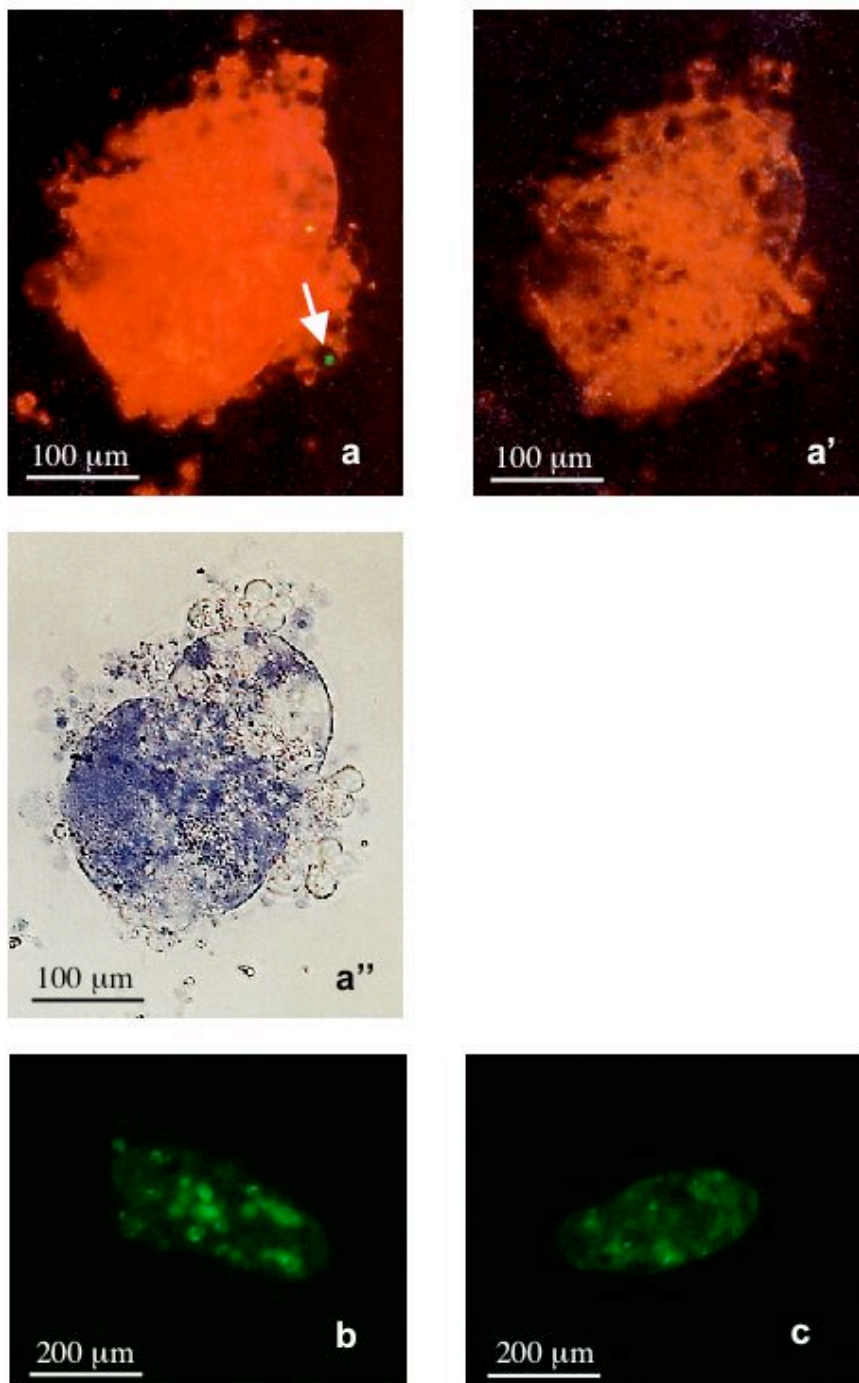


Abb. 2.8: Epifluoreszenzmikroskopische EGFP-Detektion in Sporozysten. a: bei einem Druck von 1500 Psi mit pEGFP-G beschossene Sporozyste 48 h nach der Transfektion. EGFP ist unter Blaulichtanregung detektierbar (Pfeil); a' zu a korrespondierende Fluoreszenzaufnahme bei Grünlichtanregung; EGFP-Fluoreszenz ist nicht zu erkennen; a'' zu a korrespondierende Durchlichtaufnahme: Die Sporozysten wurde durch den Mikroprojektilbeschuss verletzt, sodass Trypan-Blau eindringen konnte. b: Fluoreszenzaufnahme einer intakten mit pEGFP-G bei einem Druck von 900 Psi beschossenen Sporozyste. c: Negativkontrolle zu b: mit pEGFP-oP transfizierte Sporozyste: Es ist kein Unterschied zu der Sporozyste in b zu erkennen. Bei der auftretenden punktförmigen Fluoreszenz handelt es sich daher um unspezifischen Hintergrund.

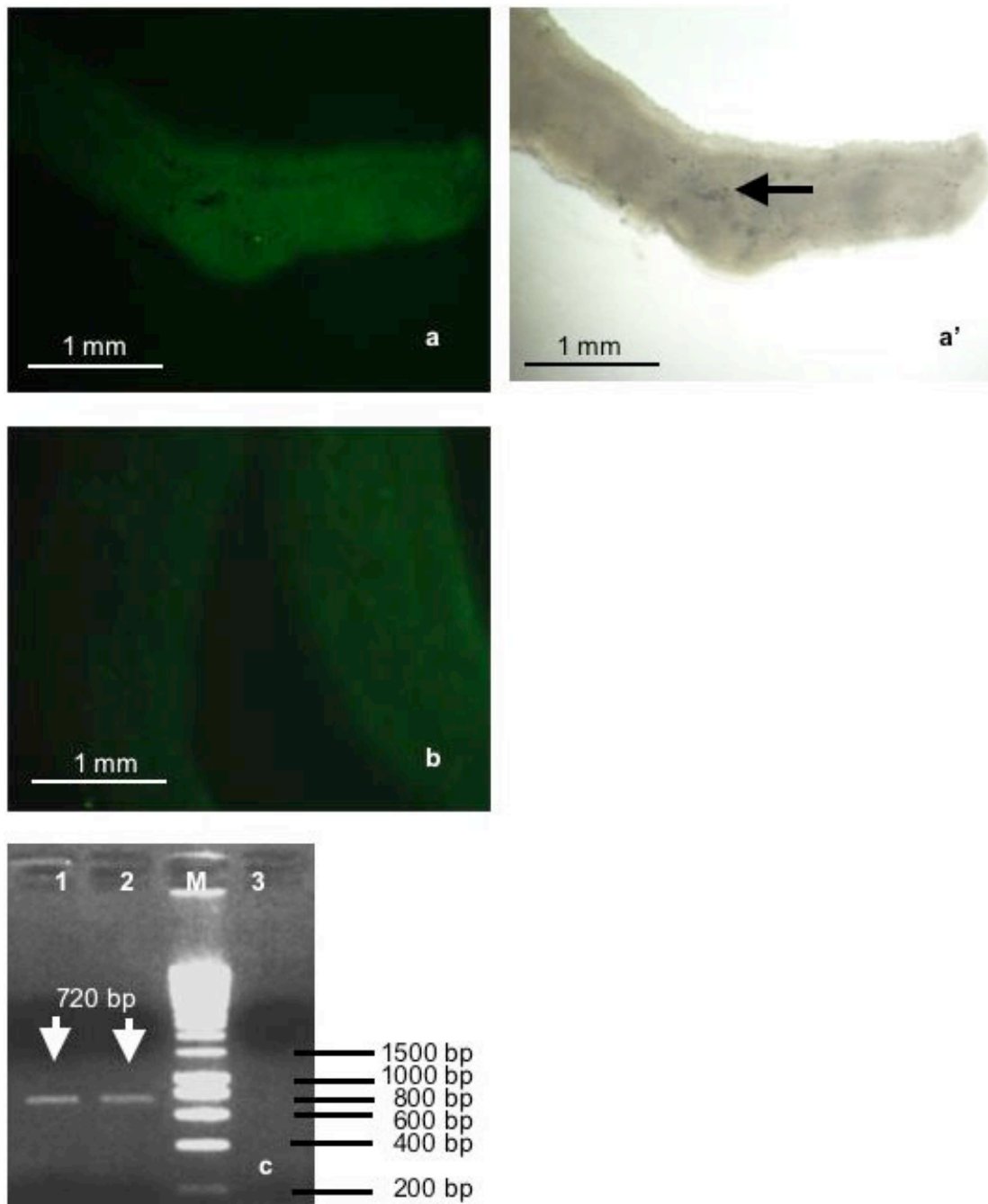


Abb. 2.9: EGFP-Expression in adulten Würmern. a: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines mit pH-EGFP-H transfizierten Wurms. a': zu a korrespondierende Durchlichtaufnahme: Goldpartikel sind in unterschiedlichen fokalen Ebenen nachzuweisen. b: Negativkontrolle: mit pEGFP-oP transfizierte Würmer: Es ist kein Unterschied zu dem Wurm in a zu erkennen. c: Nachweis der Transkription von EGFP: Nach der Isolation der Gesamt-RNA und dem Umschreiben in cDNA wurde eine PCR mit EGFP-spezifischen Primern durchgeführt. Sowohl in mit pH-EGFP-H (Spur 1) als auch in mit pEGFP-G (Spur 2) transfizierten Würmern wurde EGFP-mRNA detektiert. In der Negativkontrolle (mit pEGFP-oP transfizierte Würmer) konnte keine EGFP-mRNA detektiert werden (Spur 3).

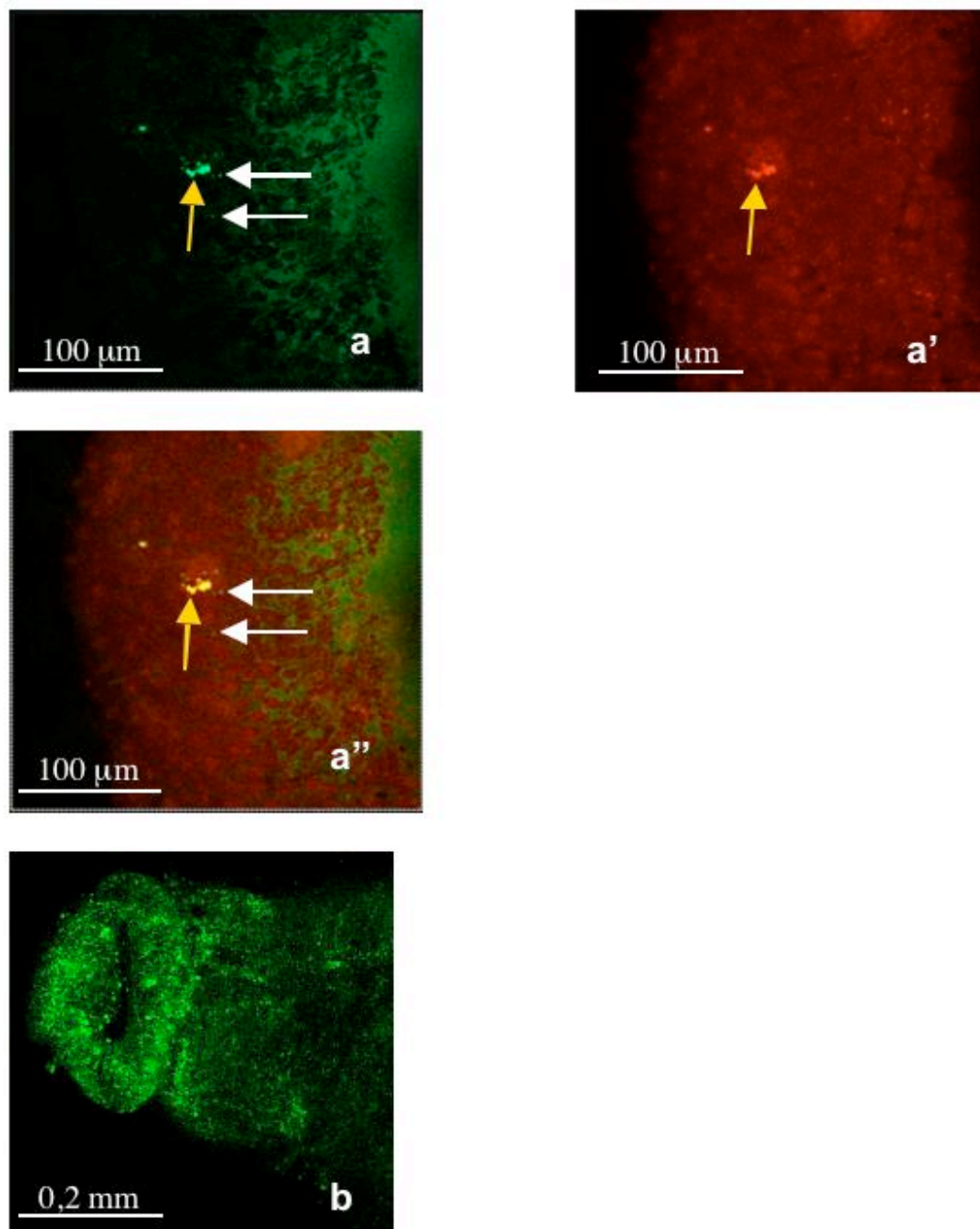


Abb. 2.10: EGFP-Detektion mit dem Laserscanningmikroskop in adulten Würmern. a: Fluoreszenzaufnahme bei Blaulichtanregung: EGFP-Fluoreszenz kolokalisiert mit einzelnen Goldpartikeln (weiße Pfeile); a': zu a korrespondierende Fluoreszenzaufnahme bei Grünlichtanregung: EGFP Fluoreszenz ist nicht detektierbar; a'': Überlagerung von a und a': Die unspezifische Fluoreszenz auf Grund der Läsion der Oberfläche erscheint gelb (gelber Pfeil); die EGFP-Fluoreszenz setzt sich als grüne Fluoreszenz ab. b: Großflächige EGFP-Fluoreszenz im Saugnapf eines mit pH-EGFP-H transfizierten Wurms.

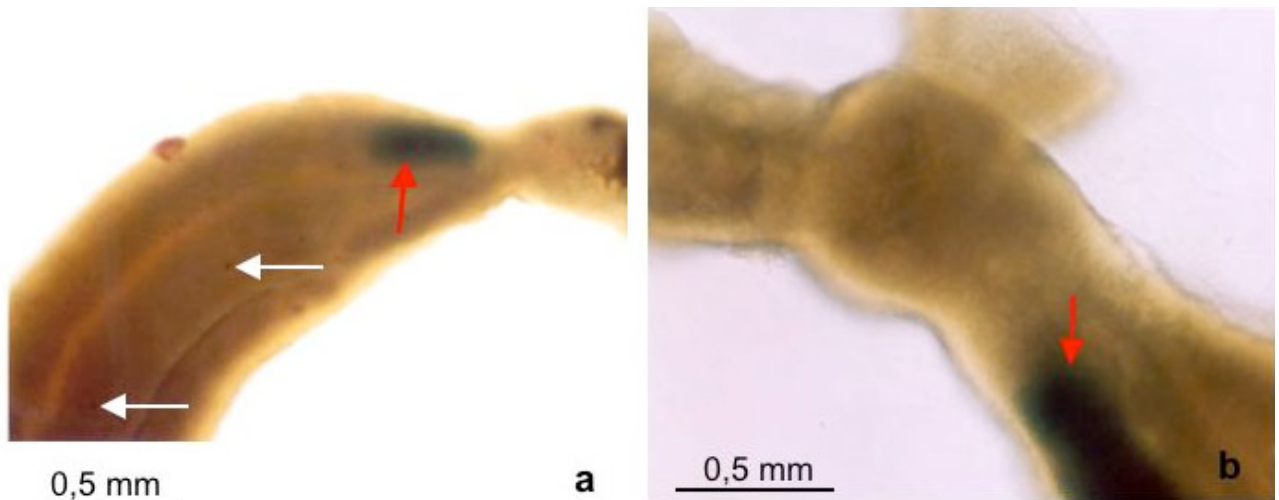


Abb. 2.11: β -Galaktosidase Expression in adulten Würmern. a: mit p β -Gal-G transfizierter adulter Wurm: Auf der Oberfläche sind Goldpartikel zu erkennen (weiße Pfeile). Ein Bereich im Bereich des Pharynx ist blau angefärbt (roter Pfeil). b: Negativkontrolle: unbeschossener Wurm, der entsprechende Bereich weist die gleiche Färbung auf.

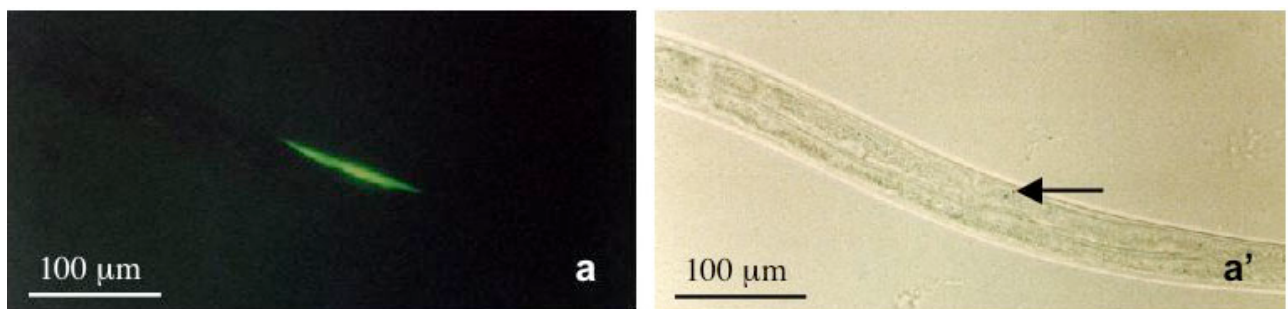


Abb. 2.12: GFP-Expression in *C. elegans*. a: Epifluoreszenzaufnahme eines mit pPD118-20 transfizierten adulten Wurms. a': zu a korrespondierende Durchlichtaufnahme: GFP wird in einer Muskelzelle exprimiert.

2.3 Versuche zur Optimierung der Expression von Reportergenen in *S. mansoni*

Die hergestellten Vektoren für die Transfektion von *S. mansoni* ermöglichen nur eine schwache Reportergenexpression. Damit ein Reporter die Funktion eines Transfektionsmarkers erfüllt, muss er leicht zu detektieren sein, wie die Transfektion von *C. elegans* in einem Kontrollexperiment zeigte (siehe Abb. 2.12). Eine Optimierung der Expression sollte durch den Einsatz weiterer Promotoren und eines weiteren Reportergens erreicht werden.

2.3.1 Klonierung der 5'-UTR des Cathepsin D-Gens

Die Aspartylprotease Cathepsin D ist entscheidend an der Energiegewinnung adulter *S. mansoni* beteiligt (Brindley et al., 2001). Der die Expression regulierende Promotor ist daher vermutlich stark und deshalb potentiell zur Expression eines Reporters in adulten Würmern geeignet. Aus diesem Grund wurde die nicht translatierte 5'-UTR des Cathepsin D-Gens als potentieller Promotor mit Hilfe der inversen PCR kloniert.

Grundlage für das Design der Primer Aspinvers1 und Aspinvers2 zur Amplifikation von 3' und 5'-Bereich der kodierenden Sequenz war die unter der Zugangsnummer U60995 in der Genbank publizierte Sequenzdaten für die cDNA des Cathepsin D (Wong et al., 1997). Der Primer Aspinvers1 zur Amplifikation des 5'-Bereiches hybridisiert mit den Basen 1 bis 17 und der Primer Aspinvers2 zur Amplifikation des 3'-Bereiches hybridisiert mit den Basen 29 bis 44 der bekannten Sequenz.

Die genomische DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut, deren Erkennungssequenzen außerhalb der gewählten Primer und außerhalb der von den Primern umschlossenen Sequenz lagen. Nach der Hitzeinaktivierung der Restriktionsendonukleasen wurde die DNA mit Hilfe von T4-Ligase zirkularisiert und die entstehenden DNA-Ringe als Matrize für eine PCR eingesetzt. Als Kontrolle für die PCR wurde neben zirkularisierter DNA geschnittene und ungeschnittene genomische DNA eingesetzt. Durch Erhöhen der Annealing-Temperatur innerhalb des PCR-Zyklus wurde eine 951 bp-Bande bei der mit *Xba* I geschnittenen und anschließend zirkularisierten DNA isoliert, die zur Sequenzierung in den 3'-T-overhang Vektor pGEM-T easy kloniert wurde (Abb. 2.13). Die Sequenzierung verschiedener Klone zeigte, dass ein 821 bp Abschnitt oberhalb des Startkodons kloniert worden war (Abb. 2.14). Weil genomische DNA Grundlage für die inverse PCR war, konnte der Transkriptionsstartpunkt nicht bestimmt werden, deswegen wurde der Translationsstartpunkt als Position 1 in der ermittelten Sequenz bezeichnet.

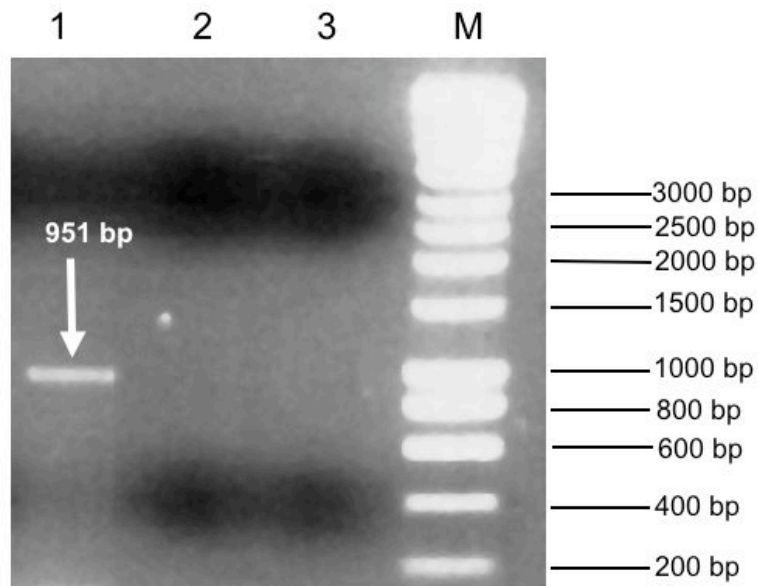


Abb. 2.13: Inverse PCR zur Klonierung der 5'-UTR des Cathepsin D. Spur 1: Amplifikation eines 951 bp-Fragmentes aus mit XbaI verdauter und ligierter schistosomaler DNA. Spur 2: Negativkontrolle: mit XbaI verdaute genomische DNA. Spur 3: Negativkontrolle: genomische DNA. M ist der Marker.

Bei der Analyse mit dem Analyseprogramm *Matinspector* (Quandt et al., 1995) wurden promotortypische Erkennungssequenzen für DNA-bindende Proteine gefunden (Abb. 2.14). Dargestellt sind die Konsensus-Elemente (NF-Y, AP1, TATA-Box), die in den bisher veröffentlichten Promotorstudien für schistosomale Promotoren als regulatorische Elemente identifiziert worden sind.

```

-821  TCTAGAACTGGGAGCATAAATGAAAGGAATGAATAGCAATCGAAAAGTGC
-771  AAAAGATTGCCGAGAACAGAGTCCGATGGGGAATCCTGGTGGACGGCCTA
-721  TGCTCCTCCACGAGGAGTAATGAGAGTTATATTCGTACACGTTACTAAGC
-671  ATATATGTTGAAGCTGTGGGTTCTCACTGTCGATTACTCCAATGTTAGGT
-621  TAGATTAGCCAAGCGTTCTCAGTTTTGGTCTAGCTAGGATTAGTTAGTGG
-571  TTTTGTGCTATGAAAATCCCACAACTCTACAAAATACTATGTTGTTAGT
-521  TACATACGTCAAGGTTCTCCATCAATACATTTTGTACATTTGAATGGCA
-471  TCAGATTCCAGAGCAGTATGTTTTCCATAATTAGCGGCTGTTATATTTCC
-421  AGTGGGAATATTGGTTGACTGCAAGGGGAAAGCTGCGGAATACGGAAGTA
-371  AGGGAGCGGGGAGGTGACGGTAAGAATAATCCAAGAAGTCAAATTTATTA
-321  ATTACCCGAACAGTGAAGCGGAGGTTATAAGACGCTAAAAGAGTGGAAAT
-271  GAGATAATGTCATATGATGGTTTAAGGGACA TGAGTCA GTACAGT CCAA
-221  TGAGGTTCTGGCAGGTTGTTGCGCTGTGGATGGAATATTGAAAAGTAAAT
-171  ATATTAAAGTAATCAAAAAAGCAAGTTCTTGTTAACGCTATGAAGTAGTA
-121  GTGAGGAGATGAATGAATGTGCATTGGCTACTTATCAGTGCCTTGGATTCT
-71   TTTGAATGTTGTTTAAATTATATTTGAATACTGTGAGTCTTAATGTGC
-21   GAGTTTTAGTTGAATGATAAGATGCTGCTTCTAGTTCTTCTTCTACACCT
+30   TGTTGCATCTGAAGTGGTTAGGTAATTTACAGTGTATAAAAGTAGTTAAG
+80   ACCTAGGATCCCTCTTCATCCGTTAAAATCTGCTCAACGCACCTCTTATTG
+130  AGTTTGAAACTTCTCTAGA

```

Abb. 2.14: Konsensussequenz der bei der inversen PCR erhaltenen Klone mit dem 5'-flankierenden Bereich des Cathepsin D. Die Primer zur Amplifikation von 5' - und 3' Bereich des Cathepsin D wurden unterstrichen; Mit +1 wurde das Desoxyadenosinmonophosphat im Startkodon (fett gedruckt) bezeichnet. Ein kurzes Intron (nt +50) (kursiv gedruckt) unterbricht die kodierende Sequenz; die Sequenz der 821 bp im nicht translatierten Bereich weist promotortypische Strukturen auf: Eine T/A-reiche Region (nt -45, hellgrau unterlegt) mit einer potentiellen TATA-Box; zwei inverse NF-Y-Konsensussequenzen (nt -95 und -408, dunkelgrau unterlegt, doppelt gerahmt) und zwei NF-Y-Konsensussequenzen (nt -629 und nt -221, dunkelgrau unterlegt); die zweite NF-Y-Konsensussequenz befindet sich unmittelbar unterhalb einer AP1-Bindungsstelle mit der Erkennungssequenz TGAGTCA (nt -234, hellgrau unterlegt). Die Sequenz wird umschlossen von zwei Xba I-Schnittstellen (umrahmt).

2.3.2 Klonierung der 5'-UTR eines Aktin-Gens

Aktin ist ein multifunktionelles und ubiquitär in eukaryotischen Zellen im cytoplasmatischen Kompartiment vorkommendes Protein. Da keine Information über die Regulation der schistosomalen Aktinengenfamilie vorliegt, wurde die 5'-UTR der verfügbaren Sequenz eines schistosomalen Aktins kloniert. Diese 5'-UTR sollte als potentiell konstitutiv exprimierender Promotor für die Transfektion eingesetzt werden. Grundlage für das Primerdesign war die unter der Zugangsnummer M80334 veröffentlichte Sequenz eines Aktins von *S.mansoni* Stamm LE Brasilien. Die

dargestellte Sequenz beginnt 158 bp oberhalb des Startkodons für die Translation. In diesem Bereich wurden bereits eine CAAT-, eine CArG, eine TATA und eine E-Box nachgewiesen (Oliveira und Kemp, 1995). Für die Isolation des 5'-UTRs des entsprechenden Aktin-Gens aus der genomischen DNA von *S. mansoni* Stamm Puerto Rico wurde die inverse PCR eingesetzt.

Der Primer Aktinrev zur Amplifikation der 5'-UTR hybridisiert mit den Basen 141 bis 158 und der Primer zur Amplifikation der 3'-UTR hybridisiert mit den Basen 734 bis 751 der bekannten Sequenz. Bei der mit *Hind* III geschnittenen und religierten DNA wurde ein 464 bp Fragment amplifiziert, das zur Sequenzierung in pGEM-T easy kloniert wurde (Abb. 2.15).

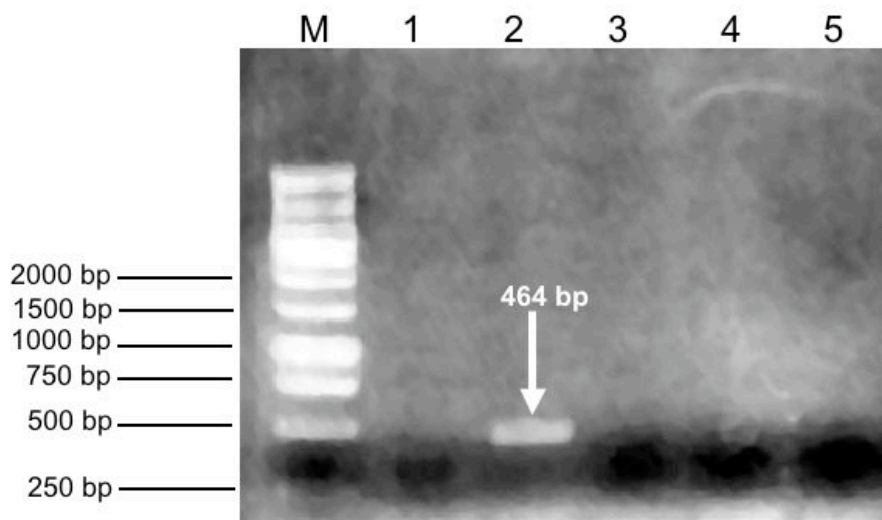


Abb. 2.15: Inverse PCR zur Klonierung der 5'-UTR des Aktin-Gens. Spur 1: Negativkontrolle: ungeschnittene DNA; Nach dem Verdau genomischer DNA mit *Hind* III (Spur 2), *Eco*RI (Spur 3), *Xba*I (Spur 4) oder *Pst*I (Spur 5) und der anschließenden Ligation wurden die DNA-Ringe als Matrize für eine PCR eingesetzt. In dem mit *Hind* III verdauten und anschließend ligierten Ansatz (Spur 2) wurde ein 464 bp-Fragment amplifiziert. M ist der Marker.

Die Sequenzierung verschiedener Klone zeigte, dass ein 388 bp Abschnitt oberhalb des Startkodons amplifiziert worden war. Auch hier wurde der Translationsstartpunkt

des Startkodons als Position 1 in der ermittelten Sequenz bezeichnet. In dem größeren Bereich der 5'-UTR wurden neben den bereits beschriebenen Erkennungssequenzen zusätzliche Konsensussequenzen für DNA bindende Proteine gefunden (Abb. 2.16). 5 % der Nukleotide der 5'-UTR des Aktins aus dem Stamm Puerto Rico unterscheiden sich von dem entsprechenden 5'-UTR aus dem Stamm LE Brasilien (Abb. 2.16).

```

-388  AAGCTTAGACACCTAATCATCTAGACAGACAGAGTTGTATCAATAATTAA
-338  CCAATCATAAATCGTATATGTCAGGCTGATTGATATCTCTTGGTCTCAAG
-288  TCTCAAAGTATTTTTATTTGCTGAAAAAGTAAGGTATCTTTTTTTACTGG
-238  AGTAGGCAGACCGAAACTCAGGC CCACATAAGGAACGTTAGAAAATTGAT
-188  TAACAATGCGGACAA CCAATAAATGATCTGGGCAGACAG CCAATAAATTA
-138  GCATTGGTAATTGCTA CATTATTGATTGAGCAAGGTGTTTACTG ATTGGT
-88   CAATTT CATAAATGTAGAGTTAG CCATTTATGGT CATTTCATCAA ACGTA
-38   TTTAGTAAAGTGAAT CAAGTGTCTCATCATCTAGTAA {ATG . . GAA}
737   GATCTTGACTGAGAGAGGTTACAGTTTACTACTACTGCAGAACGTGAAA
787   TTGTGCGAGATATAAAGGAGAAGCTT

```

Abb. 2.16: Konsensussequenz der bei der inversen PCR erhaltenen Klone mit dem 5'-flankierenden Bereich des Aktins. Die Primer zur Amplifikation von 5' - und 3' Bereich des Aktin sind unterstrichen. Mit +1 wurde das Desoxyadenosinmonophosphat im Startkodon (fett gedruckt) bezeichnet. Potentielle regulatorische Sequenzen für DNA-bindende Proteine sind umrahmt: Eine TATA-Box (nt -30, hellgrau unterlegt), eine E-Box (nt -19, gestrichelter Rahmen), zwei CArG-Boxen (nt -196 und nt -56, schwarz unterlegt), zwei CAAT-Boxen (nt -328 und nt -77, schattierte Buchstaben), zwei inverse NF-Y-Konsensussequenzen (nt -132, nt -90; dunkelgrau unterlegt, doppelter Rahmen) und drei NF-Y-Konsensussequenzen (nt -334; nt -169; nt -145, dunkelgrau unterlegt). Die Sequenz des nicht translatierten 5'-Bereiches des Aktin-Gens aus *S. mansoni* Stamm Puerto Rico besitzt drei zusätzliche Nukleotide (nt -88 C; nt -55 T und nt -43 A); 5 Nukleotidaustausche sind zu finden (nt -154 G; nt -145 T; nt -122 C; nt -85 T; nt -83 T) (fett gedruckt, unterstrichen). Die Sequenz wird umschlossen von zwei *Hind* III-Schnittstellen (umrahmt).

2.3.3 Einsatz von DsRed als Reporter

DsRed, das rot fluoreszierende Protein aus *Discosoma*, wurde aus zwei Gründen für die Transfektionsversuche eingesetzt. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass Schistosomen unter Grünlichtanregung, mit der DsRed angeregt wird, nur eine geringe Eigenfluoreszenz aufweisen. Bei dem Einsatz von DsRed als Reporter wird die Reporter-Fluoreszenz daher nicht von der endogenen Fluoreszenz überlagert, wie das für die Fluoreszenz von EGFP beobachtet wurde (siehe 2.2.3.1). DsRed besitzt außerdem eine andere Primärstruktur als EGFP und wird deswegen möglicherweise besser exprimiert (Yarbrough et. al, 2001). Die kodierende Sequenz für das DsRed lag in dem Plasmid pDsRed vor und wurde für die Klonierung mit dem 5'-Primer DsRed-for, der eine *Sma* I-Restriktionsschnittstelle einführt, und dem 3'-Primer DsRed-rev (siehe 5.2.6), der eine *Not* I-Schnittstelle einführt, amplifiziert. Für die Klonierung wurde das aufgereinigte PCR-Fragment mit *Sma* I und *Not* I verdaut.

2.3.4 Herstellung von Plasmiden unter Einsatz der 5'-UTRs des Cathepsin D- und des Aktin-Gens und von DsRed als Reportergen

Zur Herstellung von Plasmiden zur Expression von DsRed unter GST28 - oder HSP70-Promotor wurde die für EGFP kodierende Sequenz in den Plasmiden pEGFP-G und pEGFP-H gegen die für DsRed kodierende Sequenz ausgetauscht (siehe auch 3.1.3 und 3.1.4).

Zur Herstellung von Plasmiden zur Expression unter dem schistosomalen Promotor für das Aktin wurde der nicht translatierte 5'-Bereich durch PCR mit den Primern Aktin-for und Aktin-rev aus genomischer DNA isoliert. Das bei der Amplifikation zu erwartende 388 bp-Fragment umfasst den gesamten neu klonierten nicht translatierten Bereich bis zum Startkodon. Aktin-for führt eine *Hind* III-Restriktionsschnittstelle ein, Aktin-rev führt eine *EcoR* I-Schnittstelle ein. Die Promotorfragmente wurden aufgereinigt und mit *Hind* III und *EcoR* I verdaut. Zur Herstellung des Zwischenkonstruktes pEGFP-N1-A wurde der Aktinpromotor in das entsprechend geschnittene Plasmid pEGFP-N1 ligiert. Ein den Aktin-Promotor, das EGFP und den SV40-Polyadenylierungsbereich umfassendes 1,4 kb-Fragment wurde mit *Sac*I und *Afl*III aus pEGFP-N1-A ausgeschnitten und über ein Agarosegel gewonnen. Das Fragment wurde nachfolgend in das Klonierungsplasmid

pSLfa1180fa ligiert. Das hergestellte Plasmid wurde pEGFP-A genannt und ermöglicht die Expression von EGFP unter der Kontrolle des Aktin-Promotors (siehe Anhang II).

Zur Expression von DsRed unter dem Aktin-Promotor wurde die kodierende Sequenz für das EGFP gegen die für DsRed in pEGFP-N1-A ausgetauscht (siehe 3.1.3 und 3.3.3). Das entstehende Zwischenkonstrukt wurde pDsRed-N1-A genannt. Anschließend erfolgte das Umsetzen des Fragmentes aus Aktinpromotor, DsRed und Polyadenylierungsbereich aus pDsRed-N1-A in pSLfa1180fa. Das hergestellte Plasmid wurde pDsRed-A genannt und ermöglicht die Expression von DsRed unter der Kontrolle des Aktin-Promotors.

Die Herstellung eines Plasmids zur Expression von EGFP unter der Kontrolle des Cathepsin D-Promotors wurde analog durchgeführt. Nach Amplifikation des 821-bp umfassenden nicht translatierten 5'-Bereiches des Cathepsin D mit den Primern Asp-for und Asp-rev, die Restriktionsschnittstellen für *Hind* III und *Eco*R I einführen, wurden die Promotorfragmente aufgereinigt, verdaut und in pEGFP-N1 ligiert, das Zwischenkonstrukt wurde mit pEGFP-N1-CD bezeichnet. Die gesamte 1,8 kb-Kassette aus Cathepsin D-Promotor, EGFP und SV40-Polyadenylierungsbereich wurde in pSLfa1180fa umgesetzt. Das hergestellte Plasmid pEGFP-CD ermöglicht die Expression von EGFP unter dem Cathepsin D-Promotor (siehe Anhang II).

Kontrollplasmide auf der Basis des pEGFP-N1 wurden durch Austausch der EGFP kodierenden Sequenz in pEGFP-oP gegen die DsRed kodierende Sequenz (DsRed-oP) hergestellt. Durch Ligation verkürzter Fragmente ohne Promotor aus den Zwischenkonstrukten pEGFP-N1-A in pSLfa1180fa (pEGFP-oP-pSL) und DsRed-N1-A in pSLfa1180fa (pDsRed-oP-pSL) wurden Kontrollplasmide auf der Basis von pSLfa1180fa hergestellt. Das Umsetzen erfolgte mit *Eco*R I und *Afl* II.

Tab. 2.5: Übersicht über die hergestellten Plasmide zur Optimierung der Expression durch Einsatz von DsRed und den Promotoren für das Cathepsin D und ein Aktin.

Plasmid	Reporter	Promotor
pDsRed-G	DsRed	GST28
pDsRed-H	DsRed	HSP70
pEGFP-CD	EGFP	Cathepsin D
pDsRed-A	DsRed	Aktin
pEGFP-A	EGFP	Aktin
pDsRed-oP	DsRed	ohne Promotor
pDsRed-oP-pSL	DsRed	ohne Promotor
pEGFP-oP-pSL	EGFP	ohne Promotor

2.3.5 Überprüfung der Plasmide in der Zellkultur

Die Funktionalität der hergestellten Plasmide wurde wiederum in der Zellkultur nachgewiesen (siehe 2.1.5). Die Negativkontrolle wurde repräsentiert durch mit entsprechenden promotorlosen Plasmiden transfizierte Zellen (siehe Tab. 2.5). Hier konnten 48 h nach der Transfektion keine fluoreszierenden Zellen beobachtet werden. DsRed wurde unter der Kontrolle des HSP70 - und des GST28-Promotors in *cos7*-Zellen exprimiert, die Transfektionsrate betrug 0,5 %. Die Expression von EGFP unter der Kontrolle des Cathepsin D-Promotors wurde epifluoreszenzmikroskopisch in *HeLa*-Zellen nachgewiesen (Abb. 2.17 b), in *cos7*-Zellen zeigte der Promotor keine Aktivität. Die Transfektionsrate war mit 0,1 % fluoreszierender Zellen kleiner als bei den anderen Konstrukten. Der Aktinpromotor exprimierte EGFP und DsRed (Abb. 2.17 d) in *cos7*-Zellen, die Transfektionsrate betrug 0,5 %.

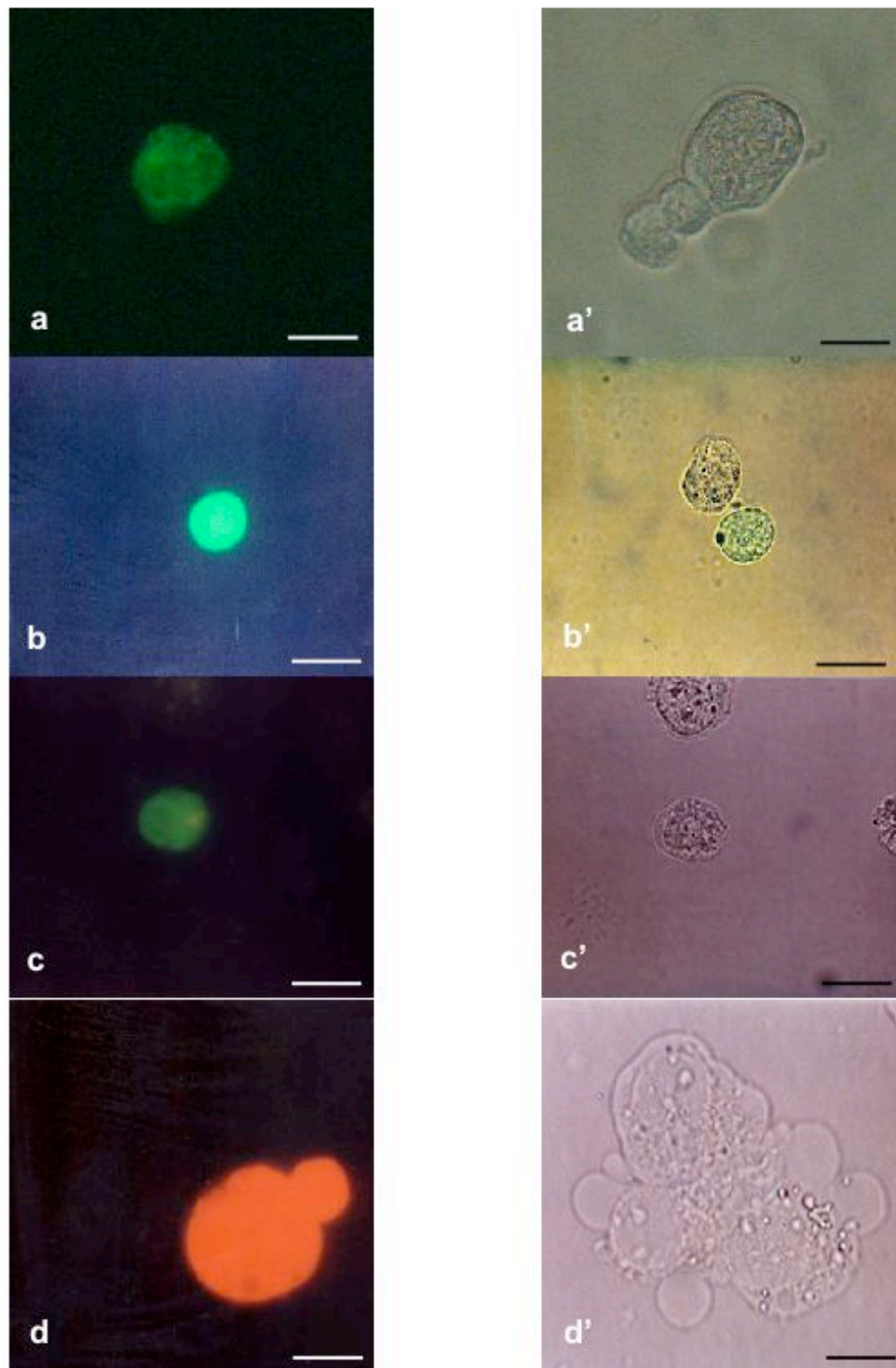


Abb. 2.17: EGFP und DsRed-Expression in *cos7*-Zellen (a, d) und *HeLa*-Zellen (b, c) unter der Kontrolle schistosomaler Promotoren. a: mit pH-EGFP-H transfizierte Zellen nach Hitzeschock; a' zu a korrespondierende Durchlichtaufnahme (siehe 2.1.8). b: mit pEGFP-CD transfizierte Zellen; b' zu b korrespondierende Durchlichtaufnahme (siehe 2.3.3). c: mit pEGFP-LTR transfizierte Zellen; c' zu c korrespondierende Durchlichtaufnahme (siehe 2.5.2). d mit pDsRed-A transfizierte Zellen; d' zu d korrespondierende Durchlichtaufnahme (siehe 2.3.3). Größenbalken 50 μ m.

2.3.6 Transfektion von *S.mansoni* mit den DsRed-Konstrukten und den Aktin und Cathepsin D-Promotorkonstrukten

Durch die Transfektion adulter Würmer und Sporozysten mit den Konstrukten pDsRed-G, pDsRed-H, pEGFP-A, pDsRed-A und pEGFP-CD durch Mikroprojektilbeschuss (siehe 2.2.3.1), sollte eine epifluoreszenzmikroskopische Detektion des Reporters ermöglicht werden, wie sie bei der Transfektion von *C. elegans* beobachtet wurde (siehe Abb. 2.12 S. 49).

Epifluoreszenzmikroskopisch konnte weder EGFP noch DsRed-Expression unter der Kontrolle des Cathepsin D-Promotors oder des Aktin-Promotors nachgewiesen werden. Auch der epifluoreszenzmikroskopische Nachweis der DsRed-Expression unter der Kontrolle des GST28- und des HSP70-Promotors gelang nicht. Dies bedeutet, dass durch den Einsatz dieser neuen Konstrukte die Expression eines Reporters für die transiente Transfektion gegenüber den zuerst eingesetzten Konstrukten (siehe 2.2.3.1) nicht verbessert werden konnte. Deswegen wurden weitere Analysen der Expression am Laserscanningmikroskop nicht durchgeführt. Die Transkription von DsRed durch RT-PCR wurde nicht überprüft.

2.4 Versuche zum Einschleusen von transgenen Mirazidien in den Lebenszyklus

Für die Herstellung transgener Wurmlinien ist es notwendig, ein transgenes Stadium in den Lebenszyklus einzuschleusen. Mirazidien infizieren auf natürliche Weise die Zwischenwirtsschnecke. Deswegen wurde untersucht, ob Mirazidien durch Mikroprojektilbeschuss transfiziert und anschließend in den Lebenszyklus eingeschleust werden können.

2.4.1 Überprüfung des Mikroprojektilbeschusses *in vitro*

In Vorversuchen wurde nachgewiesen, dass Mirazidien nach einer kurzen Inkubation in einem Vakuum von 15 mm Quecksilbersäule vital waren. Das Austrocknen wurde durch das Aufbringen auf eine Polycarbonatmembran während des Mikroprojektilbeschusses verhindert. Ca. 500 Mirazidien wurden unter den gleichen Bedingungen beschossen wie Sporozysten (siehe 3.2.3). Der Beschuss wurde zunächst nur mit 0,6 mg Gold durchgeführt. Die Überlebensrate der Mirazidien betrug 40 - 60 %. Nach dem Beschuss wurden überlebende Mirazidien für die Umwandlung in Muttersporozysten über Nacht bei 28°C in Sporozystenkulturmedium

(MEMSE-J) kultiviert. In 15 % der Muttersporozysten konnten bei der mikroskopischen Untersuchung Goldpartikel nachgewiesen werden. Anhand peristaltischer Bewegungen und schlagender Wimpernzellen in den Protonephridien wurde ihre Vitalität bestätigt. Bis auf die Goldpartikel unterschieden sie sich nicht von Muttersporozysten, die sich aus unbeschossenen Mirazidien entwickelt hatten. Die eingedrungenen Goldpartikel ließen sich in unterschiedlichen fokalen Ebenen nachweisen, was bedeutet, dass auch tiefere Gewebeschichten beim Mikroprojektilbeschuss erreicht worden waren (Abb. 2.18).



Abb. 2.18: *In vitro* generierte Muttersporozyste, die sich aus einem beschossenen Mirazidium entwickelt hat. Die Muttersporozyste ist in drei verschiedenen mikroskopischen Bildebenen dargestellt, in denen sich Goldaggregate (schwarze Pfeile) nachweisen lassen. Die Sporozyste weist ein intaktes Protonephridialsystem (gelber Pfeil) auf. Größenbalken 100 µm.

2.4.2 Überprüfung des Mikroprojektilbeschusses *in vivo*

Um den Infektionsverlauf beschossener Mirazidien zu untersuchen, wurden Zwischenwirtsschnecken mit einem maximalen Durchmesser von 0,5 cm mit 250 beschossenen Mirazidien infiziert. Durch die starke Infektion sollte ein Wiederauffinden der Muttersporozysten im Zwischenwirt erleichtert werden. Der Vorgang des Eindringens wurde mikroskopisch verfolgt und war nach 3 h abgeschlossen. Mikroskopisch konnten keine Unterschiede zum Infektionsverlauf einer Schnecke mit unbeschossenen Mirazidien beobachtet werden. Nach 10 Tagen wurden die infizierten Schnecken histologisch untersucht. Nicht infizierte Schnecken wurden mit infizierten Schnecken, die mit beschossenen und unbeschossenen Mirazidien infiziert worden waren, verglichen. Muttersporozysten wurden in der

Nierenregion der Zwischenwirtsschnecke gefunden. Muttersporozysten, die sich aus beschossenen Mirazidien entwickelt hatten, unterschieden sich von den Muttersporozysten, die sich aus nicht beschossenen Mirazidien entwickelt hatten, durch 1-2 μ m große Goldpartikel, die als optisch dichte Strukturen zu erkennen waren. Durch den Nachweis von Goldpartikeln in unterschiedlichen fokalen Ebenen wurde gezeigt, dass unterschiedliche Gewebe innerhalb der Sporozyste durch den Mikroprojektilbeschuss erreicht worden waren. Einige Goldpartikel kolokalisierten mit den Keimballenzellen innerhalb der Keimballen (Abb. 2.19). Die Nukleoli der Keimballenzellen waren heller und größer. Die Integrität der Muttersporozysten nach ihrer Entwicklung aus beschossenen Mirazidien *in vivo*, konnte auch durch ihr Wachstum nachgewiesen werden: Ihre Keimballen unterschieden sich in der Entwicklung und Größe nicht von den Muttersporozysten, die sich aus unbeschossenen Mirazidien entwickelten. Vakuolen innerhalb der Nukleoli der Keimballenzellen, die als hellere Bereiche zu erkennen waren, wiesen auf eine starke rRNA-Synthese und eine damit verbundene starke Proteinsynthese hin. Das Heterochromatin in den Keimballenzellen ist ein weiterer Hinweis auf eine starke Stoffwechselaktivität der Muttersporozysten. Die Kolokalisation von Goldpartikeln mit den Keimballen und die Integrität und Aktivität der Sporozysten in den Schnecken ist der Nachweis, dass beschossene Mirazidien in der Lage sind, Zwischenwirtsschnecken zu infizieren und sich als Sporozysten zu etablieren. Auch ihr weiteres Wachstum wird durch den Mikroprojektilbeschuss nicht beeinflusst.

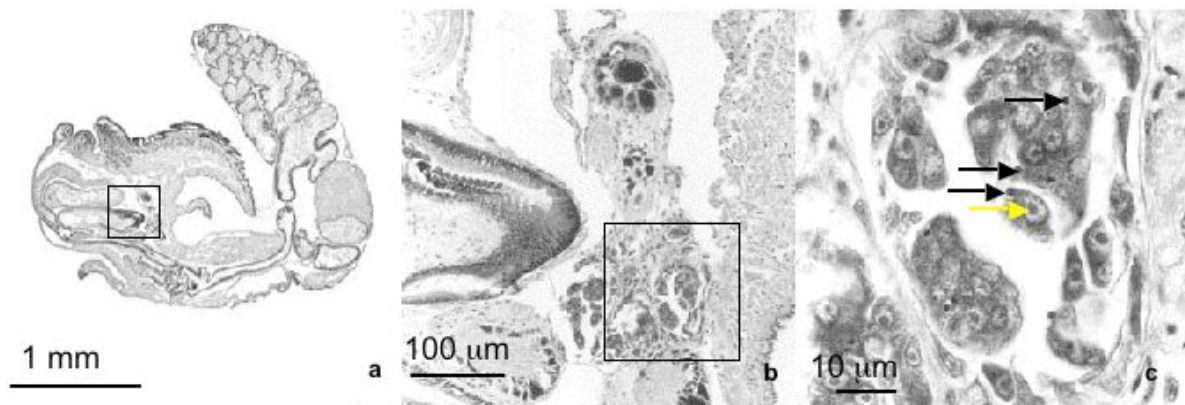


Abb. 2.19: Paraffinschnitt von *Biomphalaria glabrata* zwei Wochen nach der Infektion mit beschossenen Mirazidien (Färbung Haema-toxylin/Eosin). a: Überblick über den Schnitt durch Maul, Mittelkörper, Kopf und Fuß der Schnecke. Die Box markiert die Nierenregion, die mit Sporozysten infiziert ist. b: Vergrößerung des Ausschnittes in a: Die Box markiert die Region, in der Sporozysten in der Nierenregion der Schnecke liegen; links oberhalb ist die Radula der Schnecke zu erkennen. c: Vergrößerung des Ausschnittes in b mit einer Nahaufnahme einer Sporozyste. Die schwarzen Pfeile markieren Goldpartikel, die in unmittelbarer Nähe von Keimballenzellen liegen. Der gelbe Pfeil markiert im Vergleich den Nukleolus einer Keimballenzelle.

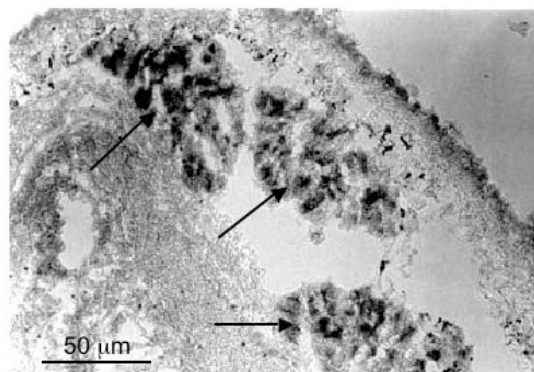


Abb. 2.20: Immunhistochemischer Nachweis von Sporozysten in einem Gefrierschnitt von *Biomphalaria glabrata* 10 Tage nach der Infektion mit unbehandelten Mirazidien (primärer Antikörper: Maus-Infektionsserum gegen *S. mansoni*; sekundärer Antikörper IgG-Ziege-Anti-Maus, Peroxidase-gekoppelt). Die Struktur schlechter erhalten als in den Paraffinschnitten, dennoch ist der Nachweis von drei Sporozysten (Pfeile) möglich.

2.4.2 Nachweis der Reportergenaktivität in der Zwischenwirtsschnecke

Mit dem Plasmid pH-EGFP-H durch Mikroprojektilbeschuss transfizierte Mirazidien wurden für die Infektion von Schnecken eingesetzt, um die Expression von EGFP im Zwischenwirt nachzuweisen.

Zehn Tage nach der Infektion wurden Kryoschnitte von den infizierten Schnecken angefertigt. Als Negativkontrolle dienten Schnecken, die mit unbehandelten Mirazidien infiziert worden waren.

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Gefrierschnitte am Epifluoreszenzmikroskop und am Laserscanningmikroskop wurde keine EGFP-Fluoreszenz detektiert. Kryoschnitte wurden außerdem immunhistochemisch mit einem anti-EGFP Antikörper, der zuvor erfolgreich in einem Western-Blot zur Detektion von EGFP getestet worden war, angefärbt. EGFP konnte auf diese Weise in den Schnecken nicht nachgewiesen werden, obwohl es möglich war in einem Kontrollversuch Sporozysten mit Infektionsserum nachzuweisen (Abb. 2.20). Auch durch Western-Blot-Analyse konnte in der Nierenregion von Schnecken, die mit transfizierten Mirazidien infiziert worden waren, kein EGFP nachgewiesen werden. Um die Transkription von EGFP nachzuweisen, wurde daher in zwei unabhängigen Infektionsversuchen die gesamte RNA aus einer Schnecke isoliert und in cDNA umgeschrieben. Durch eine *nested* PCR konnte die Transkription von EGFP in der Zwischenwirtsschnecke nachgewiesen werden (Abb. 2.21).

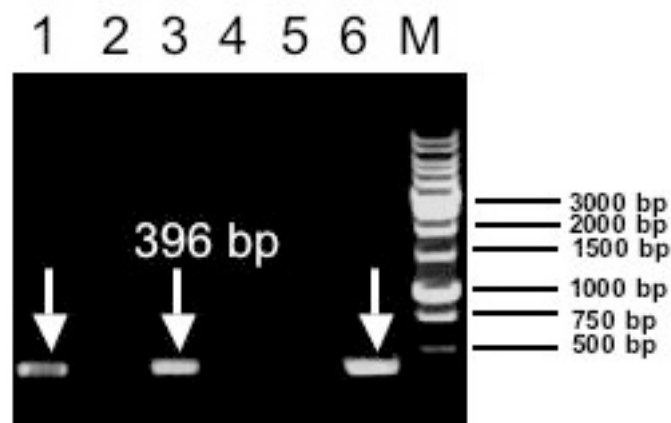


Abb. 2.21 EGFP-Transkription im Gewebe einer Schnecke, die mit Mirazidien infiziert worden war, die zuvor mit H-PEGFP-H transfiziert worden waren. Spur 1 und 3: *Nested* PCR mit EGFP-spezifischen Primern; Spur 2 und 4: Negativkontrolle: Gesamt-RNA vor der Umschreibreaktion; Spur 5: Negativkontrolle: *Nested* PCR mit EGFP-spezifischen Primern und genomischer DNA aus nicht infizierten Schnecken als Matrize; Spur 6: Positivkontrolle: PCR mit EGFP-spezifischen Primern und Plasmid-DNA als Matrize. M ist der Marker. Die Spuren 1/2 und 3/4 zeigen Daten aus unabhängigen Versuchen.

Da der Nachweis von EGFP nur auf der Ebene der Transkription möglich war, wurde versucht, β -Galaktosidase als Reporter in den Schnecken nachzuweisen.

Mit dem Plasmid β -Gal-G, das eine Expression von β -Galaktosidase unter der Kontrolle des GST28-Promotors ermöglicht, wurden Mirazidien transfiziert und für die

Infektion von Schnecken eingesetzt. Nach 10 Tagen wurden die Schnecken fixiert und die β -Galaktosidase in den fixierten Geweben histologisch nachgewiesen. Die Schnitte von Schnecken, die mit transfizierten Mirazidien infiziert waren, unterschieden sich nicht von Schnitten der Schnecken, die als Negativkontrolle mit unbehandelten Mirazidien infiziert worden waren. Große Bereiche im Schneckenewebe waren angefärbt, eine eindeutige Kolo-kalisation von Sporozysten mit Goldpartikeln und einer spezifischen Färbung konnte nicht festgestellt werden. Um zu testen, ob sich β -Galaktosidase im Gesamtproteinextrakt messen lässt, wurde die endogene Aktivität in mit unbehandelten Mirazidien infizierten und in nicht infizierten Schnecken untersucht (Abb. 2.22). Für die Infektion wurden Schnecken, die unter gleichen Bedingungen gehalten wurden und die eine gleiche Größe besaßen, eingesetzt. Die Infektion mit 250 Mirazidien lag zum Zeitpunkt des Tests 10 Tage zurück.

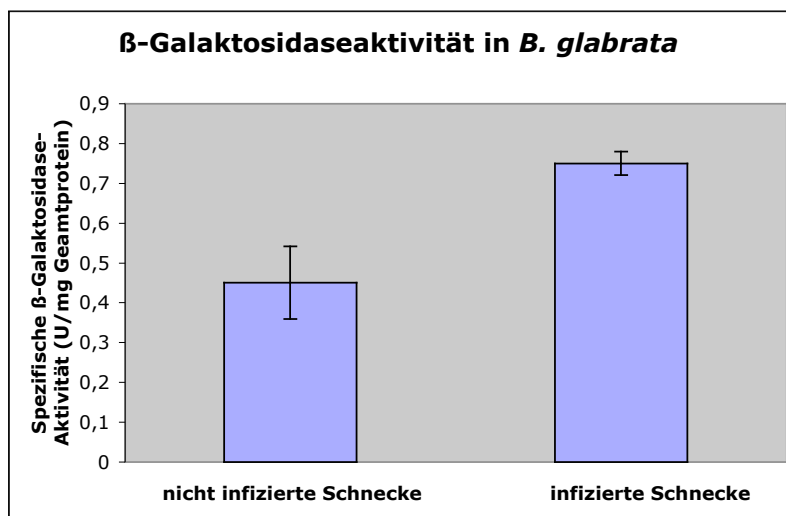


Abb. 2.22: Ermittlung der endogenen β -Galaktosidaseaktivität in nicht infizierten und infizierten Zwischenwirtsschnecken Die Schnecken, aus denen der Gesamtproteinextrakt, gewonnen wurde, wurden unter den gleichen Bedingungen gehalten. Die Schnecken waren zu dem Zeitpunkt der Proteinextraktion gleich groß, die Infektion war 10 Tage zuvor erfolgt. Dargestellt sind die Mittelwerte inkl. Standardabweichung, die aus den Dreifachbestimmungen berechnet wurden.

In infizierten Schnecken betrug die endogene β -Galaktosidaseaktivität 0,75 Einheiten/mg Gesamtprotein, das entspricht einer Steigerung von 66,7 % gegenüber den nicht infizierten Schnecken ($p=0,003$), die eine β -Galaktosidaseaktivität von 0,45

U/mg Gesamtprotein aufwiesen (Abb. 23). Das bedeutet, dass sich allein durch die Infektion mit unbehandelten Mirazidien die endogene β -Galaktosidase-Aktivität in den Schnecken erhöht. Weil dieser Anstieg an endogener β -Galaktosidaseaktivität möglicherweise die Expression von β -Galaktosidase in transfizierten Mirazidien überlagert, wurden keine weiteren Versuche mit transfizierten Mirazidien durchgeführt. Die β -Galaktosidase erwies sich als nicht ausreichend sensibler Reporter, um die Expression eines Reporters auch auf Proteinebene nachzuweisen.

2.4.3 Überprüfung der Transfektion von Keimballenzellen

Der Nachweis einer Transfektion der Keimballen wird durch den Nachweis von Reporter-Transkripten in Zerkarien, die sich aus transfizierten Mirazidien entwickelt haben eindeutig geführt, weil die ungeschlechtliche Vermehrung innerhalb der Schnecke von Muttersporozysten über Tochtorsporozysten zu den Zerkarien durch Teilung der Keimballenzellen erfolgt. Um die Transfektion dieser Zellen zu überprüfen, wurde daher die gesamte RNA aus Zerkarien, die sich aus mit pH-EGFH-H transfizierten Mirazidien entwickelten, isoliert. Auch durch eine *nested* PCR mit EGFP-spezifischen Primern war der Nachweis von EGFP-Transkripten in den Zerkarien in zwei unabhängigen Versuchen nicht möglich.

2.5 Versuche zur Charakterisierung des endogenen Retrotransposons *Boudicca*

Im BAC-Klon 53-J-5 mit genomischer DNA aus *S. mansoni* (Le Paslier et al., 2000), wurde die Kopie eines endogenen *long terminal repeats* (LTR) Retrotransposon gefunden, das *Boudicca* genannt wurde. Im haploiden schistosomalen Genom liegen 1000 bis 10000 Kopien dieses Retrotransposons vor. Bei der Sequenzierung der vorliegenden Kopie wurden zwar die typischen Domänen LTR, *gag*-Gen und *pol*-Gen eines LTR-Retrotransposons gefunden, allerdings weisen Mutationen darauf hin, dass diese Kopie inaktiv ist. In dem *gag*-Gen entsteht durch eine Punktmutation ein TGA-Stoppkodon bei nt 999. Das *pol*-Gen, das in aktiven Retrotransposons in einem durchgehenden Leserahmen kodiert wird, wird in der vorliegenden Kopie durch zwei Leserahmen kodiert: Durch die Integration einer Base bei nt 3577 wird der einheitliche Leserahmen verschoben, sodass zwei offene Leserahmen ORF 2a und ORF 2b entstehen. Die Integrase-Domäne wird zusätzlich durch einen 225 bp-

Abschnitt nicht kodierender Sequenz unterbrochen. ORF 3 kodiert möglicherweise für ein *envelope*-Glykoprotein (Copeland et al., 2003) (siehe Abb. 2.25 S. 58).

Die auf RT-PCR basierenden Untersuchungen zur Aktivität von *Boudicca* im schistosomalen Genom innerhalb der Publikation von Copeland et al. (2003) wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, eine *Boudicca*-Kopie aus mRNA-Transkripten zu klonieren, die keine Mutationen enthielt. Durch Vergleich mit der degenerierten Kopie sollte eine Konsensussequenz erhalten werden, die als Grundlage für die Reaktivierung der degenerierten *Boudicca*-Kopie durch Mutagenese dienen kann.

2.5.1 Nachweis von *Boudicca*-Transkription in adulten Würmern, Zerkarien und Sporozysten

Nach der Isolation der Gesamt-RNA aus adulten Würmern, Sporozysten und Zerkarien und dem Umschreiben in cDNA wurde durch spezifische Primer, die innerhalb der Domäne für die Reverse Transkriptase von *Boudicca* in ORF 2a binden, in allen Stadien ein 447 bp-Fragment amplifiziert (Abb. 2.23). Mit Primern, die innerhalb dieses 447 bp-Fragmentes binden, wurde in einer *nested* PCR ein 183 bp-Fragment in allen Stadien amplifiziert. Zusätzlich konnte ein 1572 bp-Fragment aus der cDNA adulter Würmer mit Primern amplifiziert werden, die im ORF 1 und im ORF 2a binden. Das bedeutet, dass die ersten beiden Leserahmen als ein Transkript abgelesen werden. Für den Nachweis, dass die isolierte RNA nicht durch genomische DNA kontaminiert war, wurde als Negativkontrolle RNA nach dem Verdau mit RNase freier DNase ohne anschließende Transkription als Matrize in der PCR eingesetzt. Da es in keinem Versuch gelang, ein Fragment in der Negativkontrolle zu amplifizieren, ist der Nachweis der Transkription von *Boudicca* in adulten Würmern, Zerkarien und Sporozysten eindeutig geführt. Grundlage für das Design der Primer war die Sequenz der *Boudicca*-Kopie im BAC-Klon 53-J-5 (Copeland et al., 2003).

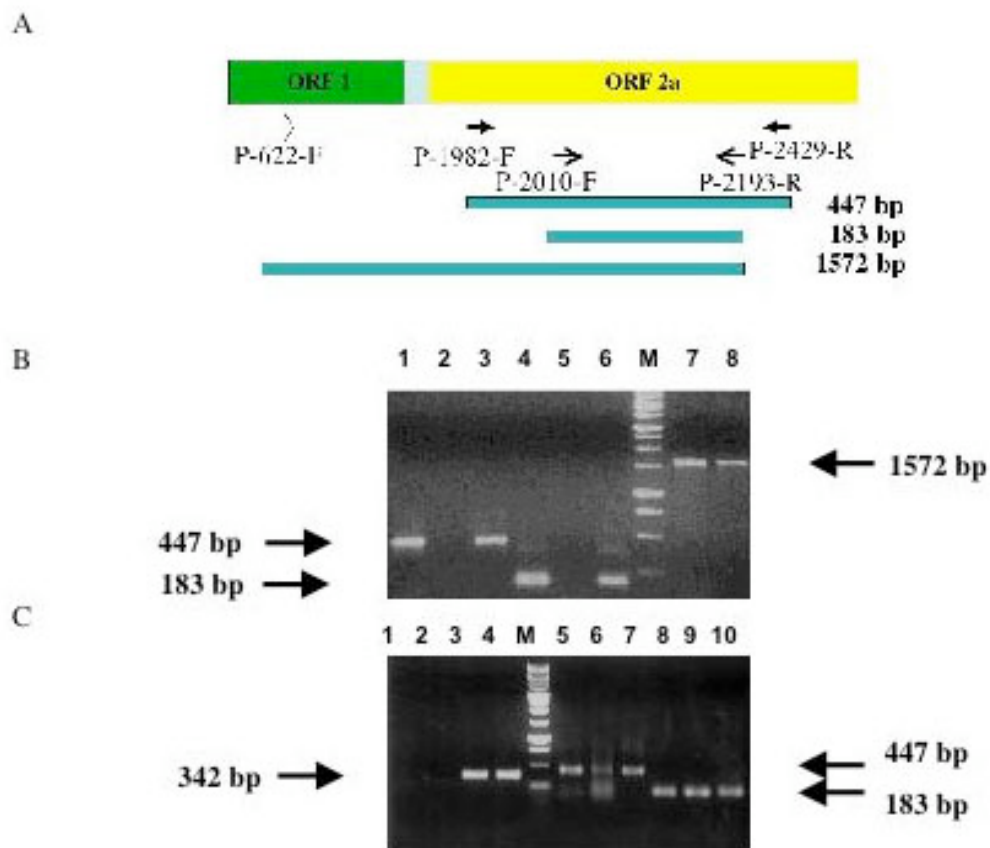


Abb. 2.23: Nachweis der Transkription des endogenen Retroelementes *Boudicca* in adulten Würmern, Zerkarien und Sporozysten. A: Schematische Übersicht zum Nachweis von *Boudicca*-Transkripten durch RT-PCR: Die ausgefüllten Pfeile repräsentieren die in ORF 2a bindenden Primer P-1982-F und P-2429-R, die in der ersten Runde der *nested* PCR eingesetzt wurden und die ein 447 bp-Transkript amplifizieren; die offenen Pfeile repräsentieren die Primer P-2010-F und P-2193-R, die in der zweiten Runde der *nested* PCR eingesetzt wurden und die ein 183 bp-Fragment reamplifizieren. Der weiße Pfeil repräsentiert den Primer P-622-F, der im ORF 1 bindet, und in Kombination mit P-2193-R ein die beiden ersten Leserahmen überlappendes Transkript mit einer Größe von 1572 bp Größe amplifiziert. B: Nach der RNA-Isolation aus adulten Würmern, DNase Verdau und anschließender reverse Transkription wurde ein 447 bp-Fragment in der ersten PCR amplifiziert (Spur 1); nach DNase Verdau ohne anschließende Transkription konnte kein Fragment amplifiziert werden (Negativkontrolle Spur 2); ein entsprechendes Fragment wurde aus genomischer DNA amplifiziert (Positivkontrolle Spur 3); mit *nested* Primern wurde ein 183 bp-Fragment aus dem 447 bp-RT-PCR-Fragment aus adulten Würmern (Spur 4) und von der Positivkontrolle (Spur 6) reamplifiziert. Eine Reamplifikation der Negativkontrolle war nicht möglich (Spur 5); ein 1572 bp-Fragment wurde aus der cDNA adulter Würmer (Spur 7) und aus genomischer DNA (Spur 8) mit Primern, die die ersten beiden Leserahmen überspannen, amplifiziert. M ist der Marker. C: Entsprechend wurde aus der cDNA von Larvenstadien ein 447 bp-Fragment in der ersten PCR amplifiziert (Spur 5: Sporozysten; Spur 6: Zerkarien); ein 183 bp-Fragment wurde aus der ersten PCR mit *nested* Primern reamplifiziert (Spur 8: Sporozysten; Spur 9: Zerkarien); entsprechende Fragmente wurden auch aus genomischer DNA amplifiziert (Spur 7 und Spur 10). Die Qualität der cDNA wurde durch Amplifikation der Cytochrom C Oxidase Untereinheit 1 (AF101196) getestet: Ein 343 bp-Fragment wurde amplifiziert (Spur 3: Sporozysten; Spur 4: Zerkarien); DNase Verdau ohne anschließende reverse Transkription zeigt, dass keine Kontamination durch genomische DNA vorlag (Negativkontrolle: Spur 1: Sporozysten; Spur 2: Zerkarien).

2.5.2 Überprüfung der Promotorfunktion des *long terminal repeats* (LTR) in der Zellkultur

Die Transkription der nachgewiesenen *Boudicca* Transkripte findet unter der Kontrolle des LTRs statt. Um seine Funktion als Promotor auch *in vitro* nachzuweisen, wurde die LTR-Sequenz am 5'-Ende aus der veröffentlichten *Boudicca*-Sequenz mit spezifischen Primern amplifiziert (Abb. 2.24) und für die Expression von EGFP eingesetzt. Der Primer LTR-for hybridisiert mit 38 Basen oberhalb der Sequenz für das LTR, die unter der Zugangsnummer BK000439 in der Genbank veröffentlicht ist, im BAC-Plasmid. Der Primer LTR-rev hybridisiert innerhalb der veröffentlichten Sequenz für *Boudicca* mit den Basen 335 bis 354 im *gag*-Gen. Die Herstellung des Plasmids EGFP-LTR, das die Expression von EGFP unter der Kontrolle des LTR ermöglicht, erfolgte analog der Klonierung von pEGFP-A und pPEGFP-CD (siehe Anhang II).

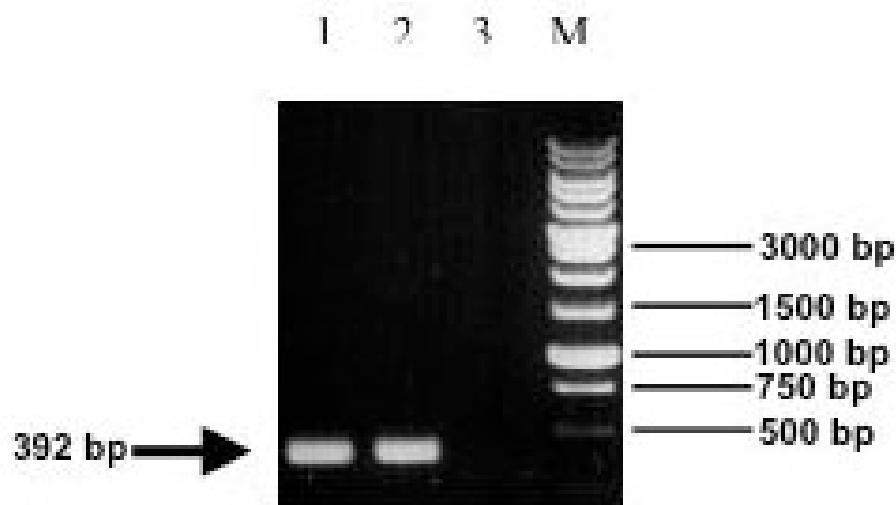


Abb. 2.24: Isolation des LTR von *Boudicca* aus BAC-DNA Klon 53-J-5. Spur 1 und 2: Amplifikation des 392 bp Fragmentes mit der Sequenz des LTR. Spur 3: Negativkontrolle: PCR ohne BAC-DNA als Matrize. M ist der Marker.

Die Funktionalität des hergestellten Plasmids pEGFP-LTR wurde in Kulturzellen nachgewiesen (siehe 2.1.5 und 2.3.5). EGFP wurde 48 h nach der Transfektion epifluoreszenzmikroskopisch in 2 % der *HeLa*-Zellen nachgewiesen (Abb. 2.17 c S.

58). EGFP-Fluoreszenz trat nicht in der Negativkontrolle auf, die durch mit pEGFP-oP-pSL transformierte Zellen repräsentiert wurde (Tab. 2.5 S. 58). In *cos7*-Zellen wurde keine EGFP-Fluoreszenz detektiert.

2.5.3 Klonierung eines vollständigen *Boudicca*-Transkriptes

Mit Primern, die auf der *Boudicca*-Kopie 53-J-5 basieren, wurden in zwei unabhängigen Versuchen drei überlappende Fragmente, RC1-6, aus der cDNA adulter Würmer amplifiziert, die einen Bereich von dem Start-Kodon (nt 622) im *gag*-Gen bis zum Stopp-Kodon (nt 4464) im *pol*-Gen bzw. bis zur Position nt 4428 im *pol*-Gen überspannen (Abb. 2.25).

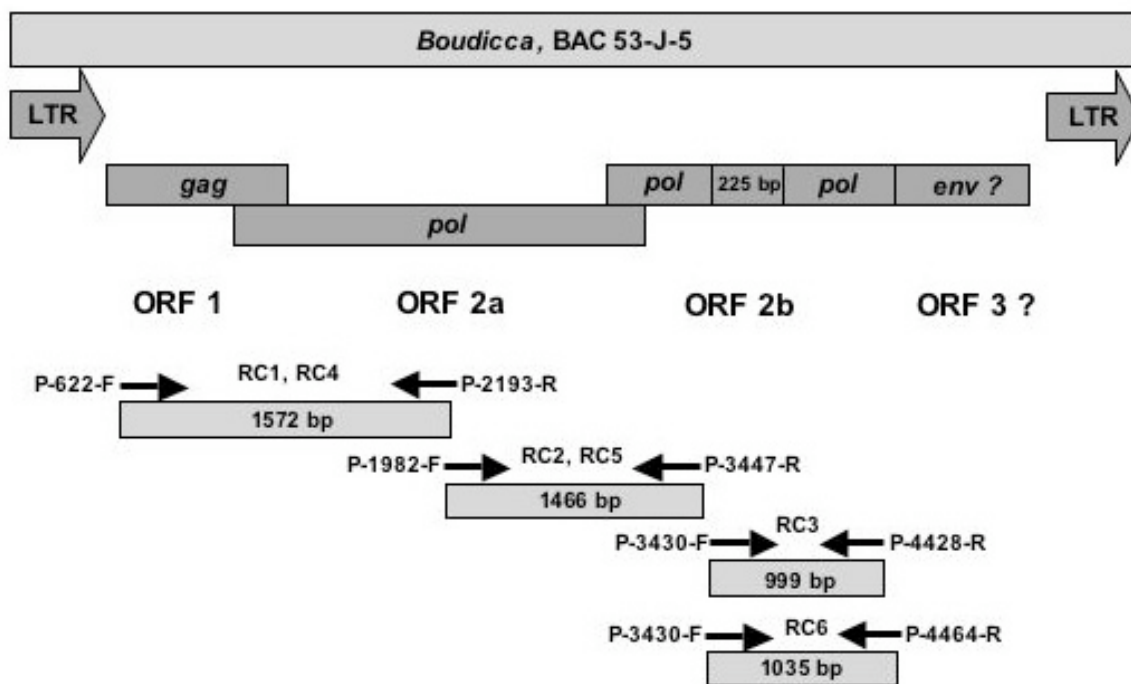


Abb. 2.25: Übersicht über die *Boudicca*-Kopie im BAC-Klon 53-J-5 und Darstellung der Klonierung eines vollständigen *Boudicca*-Transkriptes aus der cDNA adulter *S. mansoni*. Die *Boudicca*-Kopie aus dem BAC-Klon 53-J-5 ist degeneriert: Das *pol*-Gen wird durch zwei offene Leserahmen kodiert (ORF 2a und 2b) und durch einen 225 bp-Abschnitt unterbrochen, der sich zunächst durch Sequenzanalyse nicht zuordnen ließ. Ob ein dritter Leserahmen tatsächlich für ein *envelope*-Glykoprotein kodiert (ORF 3) konnte nicht eindeutig ermittelt werden. Die LTRs weisen *Boudicca* als LTR-Retrotransposon aus (Copeland et al., 2003). Um die Organisation von transkribierten *Boudicca*-Kopien zu untersuchen, wurde die RT-PCR eingesetzt. Nach der RNA-Isolation aus adulten Würmern, DNase Verdau und anschließender reverser Transkription wurden drei überlappende Fragmente kloniert, die den gesamten Bereich vom *gag*-Gen bis zum *pol*-Gen überspannen. Sequenzdaten für RC1-RC6 sind in der Genbank unter den Zugangsnummern AY308018 bis AY308023 veröffentlicht. Die Amplifikation eines die ersten beiden Leserahmen überlappenden Fragmentes gelang nicht mit den Vorwärtsprimern P-505-F, P-532-F oder P-557-F. Die Amplifikation eines Transkriptes des potentiellen ORF 3 mit den Primern P-3430-F und P-4882-R war nicht möglich. Primer wurden nach ihrer Position in der *Boudicca*-Kopie 53-J-5 benannt.

Als Negativkontrolle wurde RNA nach dem Verdau mit RNase freier DNase ohne anschließende Transkription als Matrize in der PCR eingesetzt. In den Kontrollen gelang es nicht entsprechende Fragmente zu amplifizieren.

Die Amplifikation eines Fragmentes mit dem Primer P-3430-F und dem Primer P-4882-R, der innerhalb des potentiellen *env*-gens bindet, gelang nur aus genomischer DNA.

Der erste Leserahmen von *Boudicca*, der für das *gag*-Gen kodiert, weist im 5'-Bereich zwei Startkodons auf (Abb. 2.26); Die Amplifikation des 5'-Bereiches von *gag* mit Vorwärtsprimern, die oberhalb des zweiten Start-Kodons in Position 622 im ersten Leserahmen binden, gelang nicht. Offensichtlich wird das zweite Start-Kodon bei nt 622 als Transkriptionsstartpunkt gegenüber dem ersten Start-Kodon bei nt 505 bevorzugt. Die Analyse der tertiären Struktur der mRNA in diesem Bereich, die im Rahmen einer Kooperation wurden, ergab, dass das Startkodon in Position nt 505 innerhalb einer stabilen sekundären Struktur liegt und deswegen für die DNA-Polymerase nicht zugänglich ist. In der schistosomalen EST-Datenbank wurden aber Transkripte eines vollständigen *gag*-Gens gefunden (Zugangsnummern in der Genbank: AI395459 und AI067132), die mit dem ATG bei nt 505 beginnen.

```

505                               532
ATGACGGAACACTCACCTAAGGTTTTTAAGTTAAATCTATTCCCCCT
M T E H S P K V F K L K S I P P

557
ATTTCGATTTCAGTTAACGCCATTTGGCCTGACAATATCGAGTCCTGC
I S I Q L T P F W P D N I E S C

622
TACGTAGAAGCTCATTTTGCATGCACGGAATCACGGAC
Y V E A H F C M H G I T D

```

Abb. 2.26: Sequenz des 5'-Bereiches des *gag*-Gens aus *Boudicca*. Im Leserahmen für das *gag*-Gen liegen zwei Start-Kodons hintereinander (nt 505 und nt 622). Die Amplifikation dieses Bereiches aus den mRNA-Transkripten adulter Würmer ist nur mit dem Primer P-622-F möglich. Die Amplifikation gelingt nicht mit dem Primer P-505-F, der mit den Basen des ersten Start-Kodons hybridisiert, auch mit den dazwischenliegenden Primern P-532-F und P-557-F ist eine Amplifikation nicht möglich. Unterstrichen sind die Sequenzen, mit denen die jeweiligen durch ihre Position gekennzeichneten Primer binden.

Das *gag*-Gen in der *Boudicca*-Kopie 53-J-5 weist bei nt 999 ein TGA-Stopp-Kodon auf. Die Konsensus-Sequenz dieser Region aus den mRNA-Transkripten RC1 und RC4 weist dieses Stopp-Kodon als Mutation aus, ein intaktes Retrotransposon besitzt einen vollständigen ersten Leserahmen, der für ein *gag*-Gen kodiert (Abb. 2.27 a).

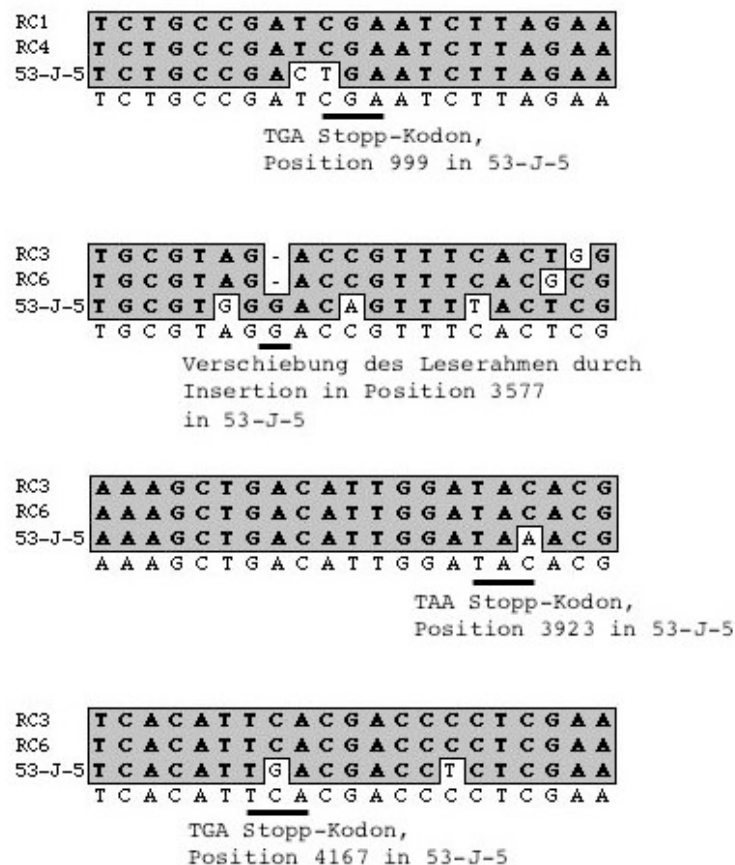


Abb. 2.27: Sequenzvergleich zwischen mutierten Regionen der 53-J-5 *Boudicca*-Kopie und den jeweiligen mRNA-Transkripten. Die Transkripte RC1 und RC4 weisen das in Position 999 liegende TGA-Stopp-Kodon in 53-J-5 als Mutation aus (a). Drei Mutationen weist die Integrase aus der 53-J-5 *Boudicca*-Kopie auf, die in den Transkripten RC3 und RC6 nicht nachgewiesen werden konnten: Eine Integration bei nt 3577 (b), die eine Verschiebung des Leserahmens zur Folge hat, ein TAA-Stopp-Kodon bei nt 3923 (c) und ein TGA-Stopp-Kodon bei nt 4167 (d).

Die Integrase-Domäne, die im zweiten ORF *pol*-Bereich kodiert wird, ist im Klon 53-J-5 am stärksten degeniert. Die Konsensus-Sequenz der Integrase-Domäne aus mRNA-Transkripten RC3 und RC6 weist die Integration des Desoxyguanosinmonophosphates bei nt 3577 und die damit verbundene

Verschiebung des Leserahmens als Mutation aus (Abb. 2.27 b). Die Stopp-Kodons TAA bei nt 3923 (Abb. 2.27 c) und TGA bei nt 4167 (Abb. 2.27 d) weitere Mutationen in der Integrase-Domäne dar. Die Analyse der mRNA-Transkripte weist darauf hin, dass im schistosomalen Genom nicht mutierte *Boudicca*-Kopien vorliegen, die transkribiert werden. Diese nicht mutierten Kopien bestehen aus einem vollständigen *gag*- und einem *pol*-Gen. Durch die Sequenzanalyse der Transkripte wird außerdem gezeigt, dass die vorliegende *Boudicca*-Kopie 53-J-5 in ihrer Struktur bis auf wenige Mutationen einer intakten Kopie ähnlich.

3 Diskussion

3.1 Entwicklung eines Transfektionssystems für Schistosomen

Transfektionssysteme sind wichtige molekularbiologische Werkzeuge: In transgenen Tieren oder Pflanzen wird durch Überexpression oder *knockout* anhand von Phänotypen die Funktion von Genen und deren regulatorischen Elementen *in vivo* untersucht (Brenin et al., 1997). Die Bedeutung von Genfunktionsanalysen in transgenen parasitischen Einzellern wurde bereits mehrfach beschrieben (Okuno et al., 2003; Kocken et al., 2002; Adamson et al., 2001; Misslitz et al., 2000). Für die parasitischen Filarien dient der freilebende Nematode *C. elegans*, für den ein etabliertes Transfektionssystem zur Verfügung steht (Brooks und Isaak, 2002; Hashmi et al., 2001), als Modellorganismus. Im heterologen *C. elegans*-System werden Promotorstudien von parasitischen Filarien durchgeführt (Kampkotter et al., 2003; Gomez-Escobar et al., 2002; Krause et al., 2001; Britton et al., 1999) oder die Funktion homologer Gene untersucht (Boag et al., 2003). Ein solcher Modellorganismus steht für den Trematoden *S. mansoni* nicht zur Verfügung. Nematoden und Trematoden stellen zudem kein einheitliches Taxon dar und sind nur weitläufig miteinander verwandt. Untersuchungen in *C. elegans* sind daher auch nicht auf Schistosomen übertragbar (Burglin et al., 1998). Deswegen muss für Schistosomen ein eigenes Gentransfersystem etabliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden der Gentransfer durch Mikroinjektion, Elektroporation oder Mikroprojektilbeschuss in *S. mansoni* untersucht.

Die Mikroinjektion ist eine gängige Methode zur Herstellung transgener Tiere, weil durch die Mikroinjektion große Mengen an DNA gezielt in einzelne Zellen transferiert werden können. Sie ist derzeit die Standardmethode zur Herstellung transgener Säugetiere. Durch die Injektion von DNA in den männlichen Vorkern einer befruchteten Eizelle integriert DNA in einer frühen Entwicklungsphase in das Genom der Wirtszelle (Brenin et al., 1997). Die Mikroinjektion wird auch zur Herstellung von transgenen *C. elegans*-Linien eingesetzt (Brooks und Isaak, 2002; Hashmi et al., 2001): Wird DNA in die Gonaden injiziert, wird die DNA direkt an die F1 weitergegeben, weil *C. elegans* ein Hermaphrodit ist (Mello et al., 1991). Außerdem ist *C. elegans* leicht zu kultivieren, sodass die Mikroinjektion weniger Individuen

ausreicht, um transgene Wurmlinien zu züchten (Brooks und Isaak, 2002; Hashmi et al., 2001).

Ausgehend von den Protokollen für *C. elegans* wurden auch andere vielzellige Parasiten, vor allem parasitisch lebende Filarien, mikroinjiziert (Higazi et al., 2002; Lok und Massey, 2002). Wie bei *C. elegans* bietet auch bei parasitischen Filarien die Kutikula auf der Oberfläche einen mechanischen Widerstand, der die Mikroinjektion erleichtert (Mello et al., 1991). Protokolle zur Mikroinjektion von Filarien können jedoch nicht direkt auf *S. mansoni* übertragen werden, weil das flexible Tegument der Schistosomen bei der Mikroinjektion geschädigt würde. Die Mikroinjektion adulter Würmer wurde in dieser Arbeit nicht durchgeführt, weil eine Implantation von mikroinjizierten Würmern in die Blutgefäße des Endwirtes experimentell schwer durchzuführen ist (Cheever et al., 1994; Basch und Humbert, 1981). Die Etablierung einer Kultur von adulten Schistosomen ausgehend ist auch nicht möglich, weil *in vitro* infertile Eier erzeugt werden (Basch, 1981).

Im Unterschied zu adulten Stadien sind Muttersporozysten möglicherweise besser für die Mikroinjektion geeignet. Auch wenn das Tegument bei der Mikroinjektion verletzt wird, entwickeln sich Muttersporozysten möglicherweise in einer Kokultur mit *Bge*-Zellen *in vitro* zu Tochttersporozysten weiter. Das Tegument der Tochttersporozysten wäre vollständig intakt und die Tochttersporozysten ließen sich in die Zwischenwirtsschnecken implantieren (Coustau und Yoshino, 2000). Die Keimballen der Muttersporozysten, aus denen die Tochttersporozysten hervorgehen, besitzen eine ähnliche Größe wie die Vorkerne von Säugetierzellen, die wie erwähnt standardmäßig zur Herstellung von transgenen Tieren mikroinjiziert werden (Uchida et al., 2001; Brenin et al., 1997). In dieser Arbeit wurden daher Transfektionsversuche von Muttersporozysten durch Mikroinjektion durchgeführt: Nach der Anpassung der Parameter konnten Farbstoffe und EGFP-Plasmide in Muttersporozysten mikroinjiziert werden. Die Kultur dieser mikroinjizierten Sporozysten war bis zu einer Woche möglich, was zur Expression der Reportergene ausreicht. EGFP-Fluoreszenz konnte auf Grund der auftretenden endogenen Fluoreszenz aber nicht beobachtet werden. Auf Grund der Verletzung durch die Mikroinjektion starben die Sporozysten nach maximal 1 Woche in der Kultur ab. Eine Implantation in die Zwischenwirtsschnecken, welche eine 20tägige Entwicklung der

Muttersporozysten zu Tochersporozysten voraussetzt (Jourdane et al., 1985), war daher ausgeschlossen. Diese Methode zur Transfektion von *S. mansoni* wurde daher nicht weiterverfolgt.

Ein weiteres Verfahren zur Transfektion ist die Elektroporation. Sie wird u.a. zur Transfektion von einzelligen Parasiten (Purdy et al., 1993; Goonewardene et al., 1993) oder zur Transfektion von vielzelligen Embryonen eingesetzt (Gehl et al., 2003; Ogura, 2002). Für die Transfektion von *S. mansoni* wurden wiederum larvale Stadien verwendet. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Elektroporierbarkeit von Muttersporozysten möglich ist. Sporozysten, die in Anwesenheit des nicht membrangängigen Fluoreszenz-Farbstoffs Propidiumiodid elektroporiert wurden, zeigten nach der Elektroporation orange-rote Fluoreszenz des Farbstoffs in der Nähe des Tegumentes. Wurden sie in Anwesenheit von EGFP-Plasmiden elektroporiert, konnten Transkripte des Reporters, der unter der Kontrolle des HSP70 und des GST28-Promotors exprimiert wurde, durch RT-PCR nachgewiesen werden. Allerdings war die Effektivität dieser Transfektionsmethode gering. Elektroporierte Sporozysten ließen sich außerdem nur eine begrenzte Zeit weiterkultivieren, sodass eine Implantation in die Zwischenwirtsschnecke nicht durchgeführt werden konnte. Die Verteilung der Propidiumiodid-Fluoreszenz ausschließlich im Tegument elektroporierter Sporozysten weist auf ein weiteres Problem bei der Elektroporation hin: Undifferenzierte Zellen, die in den Keimballen im Inneren der Sporozysten zu finden sind, werden durch die Elektroporation nicht erreicht. Feldstärken, die in der Lage sind, die äußere Membran zu elektroporieren, sind nicht in der Lage, andere intrazelluläre Organellen zu elektroporieren, die auf Grund ihrer geringeren Größe einen größeren Widerstand besitzen (Gehl, 2003). Eine Transfektion von Keimzellen durch Elektroporation ist daher nicht möglich. Die Elektroporation eignet sich aber zur transienten Transfektion von Sporozysten.

Doppelsträngige RNA (dsRNA) wurde auch durch Inkubation adulter *S. mansoni* in einer dsRNA-haltigen Lösung eingebracht (Boyle et al., 2003; Skelly et al., 2003). Bei dieser Methode wird die dsRNA nur über das Tegument aufgenommen, wenn sich die äußeren Membranen im Umbau befinden. Adulte Würmer oder aber vollständig entwickelte Sporozysten nehmen dagegen nur wenig dsRNA über ihr Tegument auf

(Boyle et al., 2003). Daher ist die Möglichkeit, Gene mit dieser Methode in den Organismus einzubringen, auf Zerkarien und Mirazidien beschränkt. Skelly et al. (2003) untersuchten in ihrer Studie auch die Möglichkeit, dsRNA durch Lipofektion in Zerkarien einzubringen. In Anwesenheit von Liposomen wurde aber keine verbesserte Aufnahme der dsRNA erreicht (Skelly et al., 2003). Hinzu kommt, dass hauptsächlich Zellen im Bereich des Tegumentes transfiziert werden (Skelly et al., 2003). Keimzellen, die im Inneren des Parasiten liegen, werden dagegen vermutlich nicht erreicht. Beide Methoden sind daher auch nicht zur Etablierung eines Transfektionssystems geeignet.

Eine weitere Methode für den Gentransfer stellt der Mikroprojektilbeschuss dar. Er wurde ursprünglich zur Transfektion von pflanzlichen Zellen entwickelt (Sanford et al., 1993), der Mikroprojektilbeschuss wird aber auch zur Transfektion von Säugetieren (Johnston, 1990), Fischen (Zelenin et al., 1991) und auch einzelligen Parasiten wie Trypanosomen (Hara et al., 2002) eingesetzt. Zu Beginn dieser Arbeit lagen zwei Untersuchungen vor, die die Transfektion von parasitischen Helminthen beschrieben haben: Durch Mikroprojektilbeschuss transfizierte *Ascaris suum* Eier und adulte Schistosomen exprimierten Luciferase (Davis et al., 1999); Jackstadt et al. (1999) wiesen die transiente Expression von GFP und β -Galaktosidase in *C. elegans* und *Litosomoides sigmodontis* nach Mikroprojektilbeschuss nach. In neueren Arbeiten wurde Luciferase- und GFP-Expression in *Brugia malayi* nach dem Mikroprojektilbeschuss nachgewiesen (Shu et al., 2003; Higazi et al., 2002). Inzwischen konnte auch GFP-Expression in adulten und larvalen Schistosomen gezeigt werden (Rossi et al., 2003; Wipperfsteg et al., 2002 a und b).

Der erfolgreiche ballistische Transfer von Plasmid-DNA durch Mikroprojektilbeschuss wurde in dieser Arbeit in cos7-Zellen durch die Expression von EGFP bestätigt. Die Transfektionsrate lag mit 3 % jedoch deutlich unter der in der Literatur mit 35 % angegebenen Transfektionsrate (Zhang et al., 2002). Die Methode war hier nicht für die Transfektion von Kulturzellen optimiert. Zellaggregate, gleichmäßige Verteilung und Abstand zur Probe beeinflussen die Transfektionsrate entscheidend.

In einem zweiten Schritt konnte die erfolgreiche Transfektion eines Vielzelllers nach Beschuss durch die GFP-Expression in *C. elegans* nachgewiesen werden. Der Einsatz des Mikroprojektilbeschusses zur Transfektion von *S. mansoni* wurde dann

durch den Einsatz von FITC-gelabelten Oligonukleotiden evaluiert (siehe 2.2.3). Nachdem in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass der Einsatz von Vakuum beim Mikroprojektilbeschuss keinen Einfluss auf die Überlebensrate von adulten und larvalen Stadien besaß, erwies sich der Druck, der zur Beschleunigung der Mikrocarrier eingesetzt wurde, als kritischer Faktor. Während adulte Würmer widerstandsfähig gegenüber dem Mikroprojektilbeschuss waren, mussten Sporozysten bei einem Druck von 900 Psi beschossen werden, um eine Schädigung des Tegumentes zu verhindern. Die Überlebensrate adulter Würmer lag bei nahezu 100 %, reproduzierbar konnte eine gute Goldverteilung auf dem Objekt erreicht werden. Mikroskopische Untersuchungen bestätigten, dass die Goldpartikel auch tatsächlich eingedrungen waren. Die Transfektionsrate lag bei ca. 5 % der adulten Würmer. Größere Fluoreszenzbereiche konnte nur in 3 der ca. 300 untersuchten adulten Würmer nachgewiesen werden. Die Expression war so gering, dass zu ihrer Detektion ein Laserscanningmikroskop eingesetzt werden musste. EGFP-Transkripte konnten durch RT-PCR-Untersuchungen detektiert werden, wohingegen der Nachweis von Protein im Westernblot nicht möglich war. Die geringe Transfektionsrate und schwache Expression wurden auch von Wipperfsteg (persönliche Mitteilung) beobachtet, sodass kein Artefakt vorliegen dürfte. Maximal 80 % der Sporozysten überlebten die Transfektion durch Mikroprojektilbeschuss. Bei Sporozysten konnte GFP-Fluoreszenz nur in einzelnen Zellen nachgewiesen werden. Der Mikroprojektilbeschuss erwies sich aber grundsätzlich als geeignet zur Transfektion von adulten und larvalen Stadien von *S.mansoni*.

3.2 Versuche zu einer transienten Transfektion

3.2.1 Expression unter der Kontrolle der eingesetzten schistosomalen Promotoren

Wenige schistosomale Gene sind bislang in ihrer genomischen Organisation bekannt (Le Paslier et al., 2000; Oliveira und Kemp, 1995; Charrier-Ferrara et al., 1992).

Zu Beginn dieser Arbeit lagen Promotorstudien des Calreticulin (CAL) (Khalife et al., 1995), der 28 kDa-Glutathion-S-Transferase (GST28) (Serra et al., 1997 und 1996; Zemzoumi et al., 1995) und des 70 kDa-Hitzeschockproteins (HSP70) (Levy-Holtzman und Schechter, 1995) vor. Neuere Promotorstudien beschreiben die

Promotoren der Cysteinprotease ER60 (Wippersteg et al., 2002 b) und des Calcineurin A (Rossi et al., 2003). Der SL-Promotor wurde von Davis et al. (1999) zur schwachen transienten Expression von Luciferase in adulten *S. mansoni* eingesetzt. Durch den Einsatz dieses Promotors wurde später auch in *Brugia malayi* fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar GFP exprimiert, weil dieser Promotor in Filarien eine starke Expression vermittelt (Higazi et al., 2002). Die unterschiedliche Stärke dieses Promotors erklärt sich aus seiner biologischen Funktion bei der Regulation des Transsspleißens: In Filarien werden 90 % der Gene transgespleißt (Blaxter und Liu, 1996; Maroney et al., 1995), während ein Transsspleißen von Genen in Schistosomen selten stattfindet (Davis et al., 1995). Der Promotor vermittelt in Schistosomen daher nur eine schwache Expression und wurde deswegen im Rahmen dieser Arbeit nicht für Transfektionsversuche eingesetzt.

In dieser Arbeit wurden der CAL, der GST28 und der HSP70-Promotor durch eine präparative PCR aus genomischer DNA isoliert. Funktionale Studien von schistosomalen Promotoren sind problematisch, weil keine schistosomale Zelllinie zur Verfügung steht. Der Nachweis der Funktionalität der hergestellten Konstrukte erfolgte daher durch die Expression von EGFP und β -Galaktosidase unter der Kontrolle dieser Promotoren in *cos7*-Zellen. Die Promotorstärken wurden durch colorimetrische Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität im Proteingestamtextrakt quantifiziert. Schistosomale Promotoren wurden bereits in der Hamsterzelllinie *CHO* (Levy-Holtzman und Schechter, 1995) und in *HeLa*- u. *Jurkat*-Zellen (Serra et al., 1997) auf ihr *cis*-aktivierendes Potential untersucht. Dies ist möglich, weil die regulatorischen Elemente und ihre assoziierenden Transkriptionsfaktoren konserviert sind, um auch in nicht-schistosomalen Zellen eine Transkription zu ermöglichen (Serra et al., 1996). In dieser Arbeit wiesen bei der qualitativen Überprüfung der Expression von EGFP und β -Galaktosidase unter der Kontrolle schistosomaler Promotoren ca. 0,5 % der Zellen Reportergenexpression auf. In der Positivkontrolle lag die Transfektionsrate bei 2,5 %. Die quantitative Analyse der schistosomalen Promotoren ergab für den CAL und den HSP70-Promotor eine Steigerung der β -Galaktosidaseaktivität um 40 % gegenüber der Negativkontrolle. Wurden die mit pEGFP-H transfizierten Zellen hitzegeschockt, betrug die Steigerung gegenüber der Negativkontrolle 25,7 %. Diese geringere Expression gegenüber den nicht

hitzegeshockten Zellen ist vermutlich auf eine Schädigung durch den Hitzeschock zurückzuführen. Der GST-Promotor erwies sich mit einer Steigerung von 128,6 % gegenüber der Negativkontrolle als der stärkste schistosomale Promotor *in vitro*. In der Positivkontrolle war die β -Galaktosidaseaktivität 297,1 % gegenüber der Negativkontrolle gesteigert. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch *cos7*-Zellen konservierte Transkriptionsfaktoren exprimieren, die für eine basale Aktivität schistosomaler Promotoren *in vitro* ausreichen.

Zur Induktion des HSP70-Promotors in dem Konstrukt pEGFP-H war kein Hitzeschock notwendig. Um den Einfluss der endogenen nicht translatierten 3'-Region (3'-UTR) des HSP70-Gens auf die Expression zu untersuchen, wurde das Plasmid pH-EGFP-H kloniert, das eine Expression von EGFP unter der Kontrolle der 5' und 3'-UTRs ermöglicht. Eine Quantifizierung der Expression von pH-EGFP-H wurde nicht durchgeführt. *In vitro* konnte aber nur nach der Induktion durch einen Hitzeschock EGFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Offensichtlich besitzt auch die 3'-UTR des schistosomalen HSP70-Gens wie bereits erwähnt regulatorische Eigenschaften. Die Bedeutung der 3'-UTR für die Vermittlung eines Hitzeschocks konnte z. B. auch in menschlichen Zellen (Moseley et al., 1993), in *Leishmania infantum* (Quijada et al., 2001), in *B. malayi* (Shu et al., 2003) und in *Theileria annulata* (Adamson et al., 2001) nachgewiesen werden. Auch andere Hitzeschockproteine wie das HSP83 aus *Leishmania* (Aly et al., 1994) sind über die 3'-UTR reguliert. Die beobachtete Expression von EGFP durch das Plasmid pEGFP-H ohne endogene 3'-UTR beruht vermutlich auf der Plasmid-Konstruktion: Das der Klonierung zu Grunde liegende Ursprungsplasmid pEGFP besitzt ein SV40-Origin (BD Biosciences Clontech USA). Eine T-Antigen-vermittelte Regulation der Transkription führt zu einer Vermehrung von Plasmiden mit einem SV40-Origin in *cos7*-Zellen (Gluzman, 1981). Die schwache konstitutive Expression durch den HSP70-Promotor (Neumann et al., 1993) ermöglicht bei einer hohen Plasmid-Zahl in der Zelle die sichtbare Expression von EGFP.

Für andere schistosomale Promotoren ist nicht bekannt, ob der 3'-UTR eine regulatorische Funktion zukommt: In Transfektionsversuchen von Schistosomen kombinierten Davis et al. (1999) den SL-Promotor mit der 3'-UTR der Enolase. Bei Calcineurin A erfolgt keine gewebespezifische Expression über die 3'-UTR (Rossi et

al., 2003). 3'-UTRs können aber spezifische regulatorische Elemente enthalten, die für die cytoplasmatische Regulation notwendig sind (van der Velden et al., 2001; Wormington, 1994). Die Polyadenylierungssequenz kann neben der Stabilisierung der mRNA regulatorische Funktionen übernehmen (Gallie, 1991), wobei auch die Länge der 3'-UTR entscheidend sein kann (Tanguay und Gallie, 1996). Um die Funktion der 3'-UTRs zu untersuchen, sind experimentelle Analysen notwendig, die in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden.

Die hexameren Polyadenylierungssequenzen für das HSP70-Gen (AATAAT) und das des CAL-Gens (ATAAAT) weisen im Vergleich zu der Konsensussequenz der Polyadenylierungssequenzen von Säugetier-mRNAs (AATAAA) nur zwei Basenaustausche auf (Zarudnaya et al., 2003). Da nicht in allen Genen, deren Promotoren in dieser Arbeit verwendet wurden, die 3'-UTRs bekannt sind, wurde die SV40-Polyadenylierungssequenz standardmäßig in allen Konstrukten eingesetzt. In Filarien wurde die Funktionalität SV40-Polyadenylierungssequenz bereits nachgewiesen (Shu et al., 2003; Jackstadt et al., 1999). Die SV40-Polyadenylierungssequenz ist deswegen vermutlich auch in Schistosomen funktional. Die Abhängigkeit der EGFP-Expression von der HSP70 3'-UTR zeigte sich bei Transfektionsversuchen von *S. mansoni* auch *in vivo*: Großflächige EGFP-Fluoreszenz konnte in 1 % der adulten Würmer, die EGFP unter der Kontrolle der 3' und 5'-UTRs des HSP70-Gens exprimieren, nach der Induktion durch einen Hitzeschock am Laserscanningmikroskop detektiert werden. Bevorzugt trat die Fluoreszenz im posterialen Ende und im Kopfbereich auf. Dieses Expressionsmuster ist vermutlich spezifisch (Wippersteg et al., 2002 a). In nicht hitzegeschockten Würmern wurde keine EGFP-Fluoreszenz detektiert. In Würmern, die mit pEGFP-H, das eine SV40-PolyA besitzt, transfiziert wurden, wurde sowohl mit als auch ohne Hitzeschock keine EGFP-Fluoreszenz beobachtet. Die Aktivität des HSP70-Promotors in dem Plasmid pEGFP-H konnte aber durch den Nachweis von EGFP-Transkripten erfolgreich gezeigt werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen von Neumann et al. (1993), die nachwiesen, dass der HSP70-Promotor in adulten Würmern konstitutiv aktiv ist und durch einen Hitzeschock noch zusätzlich induziert werden kann, wodurch die Expression verstärkt wird.

Transkription von EGFP durch den GST28-Promotor konnte in adulten Würmern nur auf mRNA-Ebene gezeigt werden.

In den Sporozysten gelang der epifluoreszenzmikroskopische Nachweis einer EGFP-Expression in einzelnen Zellen, wobei EGFP unter der Kontrolle des GST28-Promotors exprimiert wurde. Da nur wenige Zellen transfiziert waren, konnte hier kein typisches Expressionsmuster ermittelt werden. Der Nachweis einer EGFP-Transkription in Sporozysten durch den HSP70-Promotor gelang nur auf mRNA-Ebene. In den Sporozysten ist der HSP70-Promotor schwach konstitutiv aktiv und nicht durch einen Hitzeschock reguliert (Neumann et al., 1993). Transfizierte Sporozysten wurden daher keinem Hitzeschock ausgesetzt. Der CAL-Promotor führte weder in adulten Würmern noch in Sporozysten zu einer sichtbaren EGFP-Expression.

EGFP-Expression durch den CMV-Promotor, der als besonders starker Promotor in Säugetierzellen gilt und deswegen dort als Standardpromotor für die Transfektion eingesetzt wird (van der Velden, 2001), konnte in *S. mansoni* nicht nachgewiesen werden. Auch in dem apik komplexen Parasiten *Theileria annulata* ist dieser Promotor nicht aktiv (Adamson et al., 2001). Vermutlich sind im Laufe der Evolution neue Transkriptionsfaktoren hinzugekommen, sodass ein hochentwickelter Promotor wie der CMV-Promotor in Zellen mit einfachen Regulationen nicht funktional ist.

Bei allen Versuchen zur Transfektion mit schistosomalen Promotoren war die Transfektionsrate gering. Eine geringe Transfektionsrate kann durch eine ineffektive Transfektionsmethode verursacht werden. Beobachtete Expressionsmuster können wegen dieser geringen Transfektionsrate auch Artefakte darstellen: Bei der Transfektion von *B. malayi* treten bei der Transfektion durch Mikroinjektion oder Mikroprojektilbeschuss unterschiedliche Expressionsmuster, weil verschiedene Gewebe durch die unterschiedlichen Methoden transfiziert werden (Higazi et al., 2001).

Eine geringe Transfektionsrate kann aber auch auf dem Fehlen von *Enhancern*, die *in vivo* eine stärkere Expression vermitteln, beruhen. Ein SL-Promotorfragment, das 115 bp oberhalb des Transkriptionsstartpunktes endet, führte *in vitro* zu einer maximalen Luciferase-Expression. *In vivo* dagegen wurde durch längere Fragmente (341, 526 und 1038 bp) eine stärkere Luciferase-Expression erreicht (Davis et al.,

1999). Der ca. 200 bp große Minimal-Promotor des Aktin 1 aus *C. elegans* führte nur zu einer schwachen EGFP-Fluoreszenz (Jackstadt et al., 1999), wohingegen 1,2 kb des Aktin2-Promotors in *Strongyloides stercoralis* zu einer epifluoreszenz-mikroskopisch detektierbaren GFP-Fluoreszenz führten (Lok und Massey, 2002). Eine Verkürzung des Promotors der Cysteinprotease AC-2 aus *Ostertagia circumcincta* von 2,3 kb auf 0,7 kb führte zu einer signifikant niedrigeren β -Galaktosidaseexpression (Britton et al., 1999).

Die geringe Transfektionsrate lässt sich darüberhinaus durch eine gewebespezifische oder stadienspezifische Regulation in *S. mansoni* erklären:

Das Calreticulin ist ein im Endoplasmatischen Retikulum vorliegendes Ca^{2+} bindendes Protein (Scott und McManus, 1999). Da es essentiell an der Ca^{2+} -Regulation beteiligt ist, wird es in allen Stadien exprimiert und nimmt die Aufgabe eines *house-keeping*-Gens ein (Khalife et al., 1994), obgleich seine Expression gewebeabhängig ist (Khalife et al., 1995 und 94) und die Expression z.B. in einer am Kopf liegenden Drüse von Zerkarien auch für eine stadienspezifische Regulation spricht (Khalife et al., 1994). Der Promotor ist untypisch für ein *house-keeping*-Gen: Er enthält unter anderem eine TATA-Box. TATA-Boxen treten normalerweise nicht in *house-keeping*-Genen auf (Chung und Keller, 1990). Als weitere Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wurden eine AP-1 Bindungsstelle und CCAAT-Boxen ermittelt, die möglicherweise eine gewebespezifische Expression vermitteln (Khalife et al., 1995). Der fehlende Nachweis einer EGFP-Expression kann demnach unmittelbar mit der Regulation zusammenhängen: Gewebe, in denen eine starke Expression möglich wäre, werden eventuell durch den Mikroprojektilbeschuss nicht erreicht. Vermutlich sind auch nicht alle regulatorischen Bindestellen des Promotors ermittelt, da einer komplexen Regulation weitere regulatorische Elemente zu Grunde liegen müssen.

GST28 ist ein wichtiges Oberflächenantigen (Liu et al., 1996). Es wird stärker in männlichen als in weiblichen Würmern exprimiert (O'Leary und Tracy, 1991; Holy et al., 1989) und erfährt eine Bedeutung als Vakzine Kandidat (Capron et al., 1995). GST28 wird in allen Stadien konstitutiv exprimiert, vermutlich wird die Expression durch AP-1 Bindemotive und CCAAT-Boxen gewebespezifisch reguliert (Serra et al., 197 und 1996; Zemzoumi et al., 1995). GSTs sind Enzyme, die an der Zellentgiftung

und an der Beseitigung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten beteiligt sind (Brophy und Pritchard, 1994). Auch das Abtöten von Parasiten durch Immunzellen des Wirtes kann ein sauerstoffabhängiger Prozess (Kampkotter et al., 2003). Parasiten können sich durch entsprechende Entgiftungsenzyme schützen (O’Leary und Tracy, 1991). Den GSTs kommt dabei eine besondere Rolle zu: Es ist das am stärksten exprimierte Protein aus dieser Gruppe der Entgiftungsenzyme in Sporozysten (Janowsky und Zelck, 2002). Der Nachweis von EGFP in den Sporozysten kann daher auf eine stadienspezifische Aktivität des GST28-Promotors zurückzuführen sein.

Das HSP70 ist ein wichtiges schistosomales Hitzeschockprotein, das an der Entwicklung des Parasiten beteiligt ist und eine große Bedeutung für seine Pathogenität besitzt (Hedstrom et al., 1987). In den meisten Eukaryoten bilden die HSP70-Proteine eine Genfamilie. In *C. elegans* umfasst diese Familie z.B. sechs Mitglieder, von denen einige konstitutiv, andere nach einem Hitzeschock aktiv sind (Snutch et al., 1988). In *S. mansoni* ist das HSP70 dagegen ein *single copy*-Gen (Wippersteg et al., 2002 a). Es wird in allen Entwicklungsstadien außer in Zerkarien konstitutiv exprimiert (Neumann et al., 1993). Diese an das Entwicklungsstadium gebundene Transkription wird durch zwei im Promotor lokalisierte Hitzeschockelemente reguliert (Levy-Holtzman und Schechter, 1996). In dieser Arbeit wurde gezeigt, das EGFP, das unter der Kontrolle des HSP70-Promotors exprimiert wurde, im Tegument auftrat. Die Lokalisation der Expression im Tegument wird auch durch die Beschreibung des HSP70 als Oberflächenantigen unterstützt (Hedstrom et al., 1987). Da das HSP70-Gen das Hitzeschockprotein ist, das am stärksten nach einem Hitzeschock heraufreguliert wird (Vivinus et al., 2001) handelt es sich bei der Expression in den adulten Würmern um eine stadienspezifische Expression. In den Sporozysten ist der Promotor nur schwach konstitutiv aktiv und EGFP ist deshalb nur auf Transkriptionsebene nachweisbar. Wippersteg et al. (2002 b) konnten vermutlich GFP-Expression auch in Sporozysten nachweisen, weil sie in ihren Versuchen eine größere Zahl an Sporozysten auf ihre Transkription untersuchten. In besonders stark transfizierten Sporozysten konnte vermutlich auf Grund eines Gen-Dosis-Effektes GFP nachgewiesen werden.

Eine Regulation des HSP70 könnte als Anpassung an den Wirt verstanden werden: Das Überleben in einem homoiothermen Endwirt, ist nur möglich, wenn der Parasit über eine Möglichkeit verfügt, Hitzeschockproteine zu exprimieren, die ihn vor Fieberreaktionen des Wirtes schützen, auch wenn diese Temperaturschwankungen vergleichsweise gering sind. Die poikilothermen Schnecken dagegen unterliegen in ihren natürlichen Bedingungen ständig größeren Temperaturschwankungen, sodass hier eine Hitzeschockregulation nicht sinnvoll wäre.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der CAL-, der GST28- und der HSP70-Promotor starken Regulationsmechanismen unterliegen; diese Promotoren sind zwar schwach konstitutiv in fast allen Stadien aktiv, eine starke Expression wird aber gewebe- und stadienspezifisch reguliert. Die daran beteiligten Transkriptionsfaktoren sind noch nicht identifiziert worden. Die Regulation erschwert aber den Einsatz dieser Promotoren für Transfektionsversuche.

Um weitere potentielle Promotoren für die Transfektion zur Verfügung zu haben, die eine stärkere Reportergenexpression ermöglichen, wurden die 5'-UTRs des Cathepsin D und eines cytoplasmatischen Aktins kloniert. In dieser Arbeit wurden keine genauen Promotoranalysen durchgeführt und die Transkriptionsstartpunkte wurden nicht bestimmt. Die Einstufung als potentielle Promotoren gelang durch den Nachweis der Expression eines Reporters *in vitro* in *HeLa* oder *cos7*-Kulturzellen und durch eine computergestützte Analyse möglicher Bindestellen für Transkriptionsfaktoren mit dem *MatInspector* (Quandt et al., 1995). Eine Analyse von schistosomalen Promotoren mit diesen vorhandenen Algorithmen ist allerdings schwierig, weil nur wenige schistosomale Transkriptionsfaktoren bekannt sind und es dadurch zu falschen Zuordnungen kommen kann (Werner et al., 1999). Die Analyse bezog sich daher nur auf die bereits bekannten wenigen Bindesequenzen von Transkriptionsfaktoren.

Für die Transfektion können die Promotoren stark exprimierter Gene eingesetzt werden. Die Aspartylprotease Cathepsin D ist entscheidend am schistosomalen Stoffwechsel beteiligt (Brindley et al., 2001 und 1997). Deswegen wurde die 5'-UTR im Rahmen dieser Arbeit durch inverse PCR kloniert. In dem klonierten 821 bp-Fragment konnten eine potentielle TATA-Box, sowie CCAAT-Boxen und eine Bindestelle für das *activator protein 1* (AP-1) detektiert werden. TATA-Boxen finden

sich auch in den bereits beschriebenen Promotoren für das CAL, die GST28 und das HSP70 (Khalife et al., 1993; McNair et al., 1993; Neumann et al., 1992). An die CCAAT-Box können verschiedene Transkriptionsfaktoren binden (Dorn, 1987). Der Nachweis, dass der *nuclear factor 1* (NF-Y) an die CCAAT-Box des GST28-Promotors bindet, wurde von Serra et al. (1996) erbracht. Die CCAAT-Box wurde deswegen als NF-Y-Bindemotiv bezeichnet. AP1 und NF-Y-Bindemotive finden sich auch im Cal- (Khalife et al., 1995) und im GST28-Promotor (Serra et al., 1997 und 1996; Zemzoumi et al., 1995). NF-Y Bindemotive wurden auch in dem HSP70-Promotor nachgewiesen (Levy-Holtzman und Schechter, 1995). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der 821 bp-Abschnitt in der Lage ist, EGFP in *HeLa*-Zellen, nicht aber in *cos7*-Zellen zu exprimieren. Möglicherweise ist wie bei dem Calreticulin (Serra et al., 1997; Khalife et al., 1995) die AP-1 Bindestelle an der Initiation der Transkription beteiligt. AP-1 wird in *HeLa*-Zellen in ihrer Eigenschaft als Tumorzellen konstitutiv exprimiert (Soto et al., 1999). Auch von dem Dopamin 3 Rezeptor-Gen-Promotor ist nachgewiesen, dass er in *HeLa*-Zellen, nicht aber in *cos7*-Zellen exprimiert (D'Souza et al., 2001). Cathepsin D wird vermutlich in allen Stadien exprimiert, was für ein *house-keeping* Gen sprechen würde. Eine zusätzliche geschlechts-, gewebe oder stadienspezifische Regulation z.B. durch AP-1 oder NF-Y (Serra et al., 1997 und 1996; Khalife et al., 1995; Zemzoumi et al., 1995), die z.B. auch für die spezifische EGFP-Expression in *HeLa*-Zellen verantwortlich sein könnte, kann aber dennoch nicht ausgeschlossen werden. Die fehlende Nachweisbarkeit einer EGFP-Expression *in vivo* beruht daher vermutlich auf einer sehr lokalen Expression in den Blinddärmen adulter Würmer (Brindley et al., 2001), die durch den Mikroprojektilbeschuss nicht transfiziert werden können.

Auch die Promotoren von *house-keeping* Genen, die eine starke konstitutive Expression ermöglichen sind potentiell für Transfektionsversuche geeignet.

Aktine verkörpern eine hoch konservierte Familie von Genen, die in allen eukaryotischen Zellen auftreten. Globuläres Aktin (G-Aktin) kann durch Polymerisation in filamentöses Aktin (F-Aktin) übergehen (Holmes et al., 1990). Das F-Aktin unterliegt dabei einem ständigen Auf-und Abbau. Damit diese Dynamik aufrecht erhalten werden kann, muss ein endogener Pool an G-Aktin in der Zelle vorliegen, was für eine konstitutive Expression bestimmter Aktine als *house-keeping*

Gene spricht. In der Zelle werden verschiedene Aktinegene exprimiert (Sheterline und Sparrow, 1994). In Schistosomen wurde die Beteiligung von Aktin am Aufbau des Tegumentes (Kusel et al., 1984) und der Muskeln (MacGregor und Shore, 1990) nachgewiesen. Aktin liegt auch im Cytoplasma vor und ist an der Reparatur des Tegumentes bei Schistosomen beteiligt (Linder und Thors, 1992). In Schistosomen werden mehrere Aktin-Isoformen exprimiert (Abbas und Cain, 1989).

Zwei kurze Fragmente der 5'-UTRs von Aktinen, die auf Grund ihrer Homologien den cytoplasmatischen Invertebraten-Aktinen zugeordnet werden, wurden von Oliveira und Kemp (1995) beschrieben. In der veröffentlichten 5'-UTR des SmAct2, das nur 43 Basen umfasst, wurden keine regulatorischen Sequenzmotive detektiert. Das SmAct besitzt dagegen in der 5'-UTR mehrere solcher potentieller Sequenzmotive. Aber dieses 168 bp umfassende Fragment vermittelt vermutlich wegen seiner geringen Länge nur eine schwache Expression. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ausgehend von der bekannten Sequenz (Oliveira und Kemp, 1995) durch inverse PCR eine 388 bp umfassende 5'-UTR aus genomischer DNA isoliert. Die Sequenz dieses Fragmentes, das aus dem Schistosomen-Stamm Puerto Rico isoliert wurde, unterschied sich in 5 % der Nukleotide von der veröffentlichten Sequenz, die aus dem Liberianischen Stamm stammt. Unterschiede der gleichen Gene innerhalb verschiedener Schistosomen-Stämme sind auch für das HSP70-Gen beschrieben (Wippersteg et al., 2002 a). In den ersten 168 bp des Aktingens upstream des Startkodons wiesen Oliveira und Kemp (1995) potentielle regulatorische Sequenzen für eine TATA-Box, eine CAAT-Box, eine E-Box und eine CArG-Box. Innerhalb der im Rahmen dieser Arbeit klonierten 5'-UTRs lassen sich drei zusätzliche NF-Y-Bindesequenzen nachweisen, es finden sich außerdem zusätzliche potentielle regulatorische Sequenzen für eine CAAT-Box und eine CArG-Box. Wie bereits erwähnt, ist der Transkriptionsstartpunkt unbekannt. Deswegen ist die Lage des eigentlichen Promotors und der regulatorischen Sequenzen in der 5'-UTR nicht genau zu bestimmen. Das Aktin, dessen 5'-UTR kloniert wurde, wird nicht transgespliced (Oliveira und Kemp, 1995). Der eigentliche Promotor beginnt deswegen vermutlich wenige Basen oberhalb des Translationsstartpunktes.

Insbesondere die CArG-Box als Erkennungssequenz des *serum response factors* spielt eine große Rolle bei der Regulation der Aktinexpression sowohl in Vertebraten

(Marsh et al., 1998) als auch in Invertebraten (Casero und Sastre, 2001; Kusakabe, 1997). E-Boxen sind wichtige cis-regulatorische Elemente in Aktin-Promotoren aus Vertebraten (Kumar et al., 2003; Jung et al., 1999). Die von Oliveira und Kemp (1995) beschriebene E-Box und die CArG-Box liegen untypischerweise downstream der TATA-Box. Aktive E-Boxen und CaRG-Boxen liegen in den bisher beschriebenen Vertebraten-Aktin-Promotoren upstream der TATA-Box (Chow und Schwartz, 1990; Mohun et al., 1989). Diese Lage könnte ein Hinweis darauf sein, dass sie nicht an der Regulation bei der Expression des SmAct beteiligt sind (Oliveira und Kemp, 1995). Die zweite upstream liegende CArG-Box (CCACATAAGG) weist eine Mutation zu der Konsensussequenz (CC (A oder T)₆ GG) (Taylor et al., 1988) auf. Möglicherweise ist sie deswegen auch nicht an einer Regulation beteiligt. Vertebraten-Aktin-Promotoren besitzen oft bis zu 2 kb oberhalb des Transkriptionsstartpunktes liegende Enhancer-Sequenzen, die für eine starke Expression essentiell sind (Kusakabe et al., 1999; Kovacs und Zimmer, 1998), solche Enhancer sind demnach auch nicht auf dem klonierten 5'-UTR des schistosomalen Aktins zu finden, da es nicht diese Länge umfasst. Enhancer sind auch für die Aktinexpression in Invertebraten essentiell: Für die Expression des Act5C aus *Drosophila* sind Promotorfragmente >1,9 kb für eine starke Expression notwendig. Die konstitutive Expression von ACT5C erfolgt durch regulatorische Bereiche 190-450 bp upstream des Transkriptionsstartpunktes (Bond-Matthews und Davidson, 1988). In *C. elegans* gelingt keine starke Expression von GFP oder β -Galaktosidase mit dem 200 bp großen Minimal-Promotor Aktin1 (Jackstadt et al., 1999), dagegen wird durch ein 1,2 kb-Fragment des Aktin2-Promotors in *S. stercoralis* eine starke Reportergenexpression vermittelt (Lok und Massey, 2002). Die Analyse der Sequenz spricht für eine geringe Promotoraktivität, was durch Transfektionsversuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, bestätigt wurde: Das 338 bp umfassende Fragment der 5'-UTR des SmAct enthält regulatorische Elemente, die für eine basale Transkription in cos7-Zellen ausreichen, *in vivo* konnte dagegen keine Reportergen-Expression nachgewiesen werden. Hinzu kommt, dass das Smact möglicherweise einer geschlechtsspezifischen Regulation unterliegt (Busek et al., 2002).

Um geeignete Promotoren für die Transfektion von Schistosomen zu isolieren, müssen vermutlich größere Promotorfragmente isoliert werden, wobei *house-keeping* Gene des Cytoskeletts für Transfektionsversuche geeignet wären. Wie bereits erwähnt werden Aktinpromotoren häufig für Transfektionsversuche eingesetzt (Lok und Massey, 2002; Higashijima et al., 1997; Dahler et al., 1994). Gene, deren Transkripte in großer Zahl in EST-Analysen nachgewiesen werden, sind stark exprimiert (Santos et al., 1999). Deswegen könnte auch die Analyse von ESTs einen Hinweis auf besonders starke Promotoren geben. Die GAPDH wird in Zerkarien stark exprimiert (Santos et al., 1999), ihr Promotor ist daher möglicherweise für Transfektionsversuche geeignet. Die Sequenzierung und Charakterisierung von *Enhancern* kann auch für die Transfektion von Schistosomen entscheidend sein: In *C. elegans* unterliegt die Regulation der Myosin-Gene der Kooperation von gewebespezifischen Promotoren mit *upstream* liegenden gewebespezifischen *Enhancern* (Okkema et al., 1993). Vielleicht gibt es auch in Schistosomen ubiquitär funktionale Enhancer: In Säugetierzellen verstärkt ein 213 bp Fragment in der HSP70 5'-UTR die Expression unter dem SV40-Promotor und dem CMV-Promotor ohne die Induktion eines Hitzeschocks zu benötigen. Dieses System ist möglicherweise auch auf Invertebraten übertragbar (Vivinus et al., 2001).

3.2.2 Eignung der eingesetzten Reporter als Transfektionsmarker

GFP ist ein nicht invasiver Reporter, der art- und zellunspezifisch in sehr verschiedenen Organismen exprimiert wird, weil die Ausbildung der fluorophoren Gruppe autokatalytisch erfolgt und keine zelleigenen Kofaktoren benötigt (Prasher, 1995). Deswegen eignet sich GFP für die Selektion von transgenen Tieren *in vivo* (Wimmer, 2003). Wipperfsteg et al. (2002 a und b) und Rossi et al. (2003) benutzten in ihren Versuchen zur Transfektion von *S. mansoni* ein für die Expression in Pflanzen optimiertes GFP (Reichel et al., 1996) als Reporter. Nur in 5 von ca. 1000 adulten Würmern, die besonders viele Goldpartikel aufwiesen, wurde großflächige GFP-Fluoreszenz am Laserscanningmikroskop beobachtet (persönliche Mitteilung Wipperfsteg). Die beobachtete schwache GFP-Expression in Schistosomen kann auf einer geringen Transkription beruhen. Möglicherweise wird das Protein auch auf der Translationsebene falsch gefaltet, was auch eine geringe Konzentration an aktivem GFP zur Folge hätte.

In dieser Arbeit wurde versucht, die Expression eines Transfektionsmarkers für *S. mansoni* durch den Einsatz des kommerziell erhältlichen EGFP (BD Biosciences Clontech, USA) zu optimieren. Die Mutationen in dieser GFP-Variante von Phenylalanin in Position 64 zu Leucin und von Serin in Position 65 zu Threonin (Cormack et al., 1996) führen zu einer 35 fachen Verstärkung der Fluoreszenz (Cormack et al., 1996; Yang, 1996). Die schnellere Faltung der chromophoren Gruppe führt bei dieser Variante außerdem zu einer besseren Faltung bei 37°C (Cormack et al., 1996; Crameri et al., 1996). Weil adulte Würmern und Sporozysten bei 37°C bzw. 28 °C kultiviert werden, ist möglicherweise diese GFP-Variante besser zur Expression in adulten und larvalen Stadien geeignet.

Wie in dieser Arbeit dargestellt, konnte eine Verbesserung der Reporterexpression nicht erzielt werden. Die Häufigkeit des Auftretens großflächiger Fluoreszenz in adulten Würmern entsprach den Beobachtungen von Wippersteg (persönliche Mitteilung). Auch EGFP-Fluoreszenz konnte nur am Laserscanningmikroskop beobachtet werden. Der Nachweis von EGFP auf Proteinebene durch Westernblot-Analyse gelang auf Grund der geringen Expression nicht. In Sporozysten wurde in einzelnen Zellen epifluoreszenzmikroskopisch EGFP beobachtet, nachdem die auftretende Eigenfluoreszenz durch Trypan-Blau reduziert wurde. In intakten Sporozysten wurde dagegen mit dem Einsatz eines Laserscanningmikroskopes keine EGFP-Fluoreszenz festgestellt.

Die Funktionalität der eingesetzten Konstrukte und die Übertragung von Plasmid-DNA durch Mikroprojektilbeschuss wurden jedoch erfolgreich durch die Expression von EGFP in *HeLa*- u. *cos7*-Zellen nachgewiesen. Als weitere Positivkontrolle für das Einbringen von DNA in einen vielzelligen Organismus konnte die Expression von GFP nach dem Mikroprojektilbeschuss in *C. elegans* nachgewiesen werden. Dies beweist, dass eine starke GFP-Expression grundsätzlich auch epifluoreszenzmikroskopisch detektiert werden kann.

In *Arabidopsis thaliana* kommt es zu einem Fehlspleißen der Wildtyp GFP-mRNA, sodass keine vollständigen Transkripte nachzuweisen sind (Haseloff et al., 1997). Ein Fehlspleißen des EGFP in Schistosomen ist dagegen unwahrscheinlich, weil es als Protein fluoreszenzmikroskopisch, aber auch als Transkript durch RT-PCR detektiert werden konnte. Außerdem sind Signale für das *cis*-Spleißen bei *S.*

mansoni konserviert (Charrier-Ferrara et al., 1992). Diese konservierten Signale sind in der EGFP-Sequenz aber nicht enthalten.

Möglicherweise kommt es bei der Translation von EGFP zu Problemen, weil der Kodon-Gebrauch, der bei dem eingesetzten EGFP für die Expression in Säugetierzellen angepasst wurde (Haas et al., 1996), nicht geeignet zur Expression in Schistosomen ist. EGFP wurde bisher zur Expression in Pflanzen, verschiedenen Insekten, anderen Plathelminthen und Bakterien eingesetzt, lediglich die Expression in Hefen ist limitiert (Cormack et al., 1997). Für Filarien ist zur Expression von Reportern das Einführen von kleinen Intron-Sequenzen notwendig (Fire et al., 1990). Die Detektion von Fluoreszenz nach der Expression dieses für die Expression in Nematoden adaptierten GFPs unter der Kontrolle des schistosomalen GST-Promotors war nicht in *S. mansoni* möglich (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise können andere Mutationen am GFP zu einer verbesserten Expression in Schistosomen führen.

Für die Detektion von GFP oberhalb der Autofluoreszenz ist eine ausreichende Konzentration an GFP in der Zelle notwendig (Niswender et al., 1995). Dabei führt eine subzelluläre Lokalisation zu einem intensiveren Signal, weil die Expression auf einen eng umgrenzten Raum innerhalb der Zelle beschränkt ist. Das schistosomale Tegument bildet ein Syncytium, in dem GFP frei diffundieren kann. Auch in dieser Arbeit wurde GFP-Fluoreszenz beobachtet, die nicht mit Goldpartikeln kolokalisierte, was durch GFP-Diffusion zu erklären ist. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch von Wipperfsteg et al. in *S. mansoni* (2000 a) und von Jackstadt et al. in Filarien (1999) gemacht. Bei der Selektion von transgenen Insekten wird EGFP deswegen lokal in den Augen exprimiert, um die Detektion zu erleichtern (Wimmer, 2003). In *S. mansoni* besteht ein weiteres Problem darin, dass sowohl adulte als auch larvale Stadien bei der Anregung mit blauem Licht (GFP-Anregungswellenlänge 490 nm) eine starke Eigenfluoreszenz entwickeln. Dieses Phänomen konnte auch in Filarien beobachtet werden (Jackstadt et al., 1999).

Für die starke Eigenfluoreszenz in weiblichen Würmern sind bei *S. mansoni* Proteine verantwortlich, die an der Oogenese beteiligt sind, die *in vitro* nur unvollständig verläuft. Diese Proteine werden daher von weiblichen Würmern beständig ausgeschieden. Bei einer längeren Kokultur von weiblichen und männlichen

Würmern, die diese Proteine ständig passiv mit dem Medium aufnehmen, tritt endogene Fluoreszenz deswegen auch in den Männchen auf. In dieser Arbeit wurden aus diesem Grund nur separat kultivierte Männchen für Transfektionsversuche eingesetzt.

Eine weitere Reduktion der endogenen Fluoreszenz wurde durch den Einsatz von DsRed als Reporter erreicht. Schistosomen weisen bei der Anregung mit grünem Licht (546 nm DsRed-Anregungswellenlänge) nur eine geringe Eigenfluoreszenz aufweisen. DsRed besitzt außerdem eine andere Primärstruktur wird deswegen möglicherweise besser exprimiert als EGFP (Yarbrough et. al, 2001). Die Aktivierung der fluorophoren Gruppe und die Faltung des DsRed erfolgen wie bei GFP autokatalytisch (Gross et al., 2000). Wie in dieser Arbeit dargestellt, konnte jedoch die Expression von DsRed in Schistosomen nicht nachgewiesen werden.

Als weiterer Reporter wurde auch β -Galaktosidase eingesetzt. Dieser Reporter wird im Unterschied zu GFP und DsRed anaerob exprimiert. Seine Expression kann histologisch in transfizierten Geweben vielzelliger Parasiten nachgewiesen werden (Jackstadt et al., 1999; Fire, 1992). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass männliche Schistosomen eine geringere endogene Aktivität an β -Galaktosidase besitzen als weibliche Schistosomen. Dennoch kolokalisierten Goldpartikel bei der Transfektion von adulten Würmern mit β -Galaktosidase-Konstrukten nicht mit der Färbung. Nur in Sporozysten gelang der Nachweis von β -Galaktosidase bei der Expression unter der Kontrolle des GST28-Promotors. Der Nachweis einer stärkeren β -Galaktosidase-Expression in Zerkarien, die sich aus transfizierten Mirazidien entwickelten, war dagegen nicht möglich. Insgesamt zeigen diese Versuche, dass β -Galaktosidase als Reportergen für die Transfektion auf Grund der endogenen Aktivität sowohl in adulten und larvalen Schistosomen als auch in den Zwischenwirtsschnecken ungeeignet ist.

Um eine Keimzellentransfektion nachzuweisen, würde sich Luciferase eignen, die bereits in *S. mansoni* exprimiert wurde. Sogar die schwache Expression durch den schistosomalen SL-Promotor konnte durch Davis et al. (1999) gezeigt werden. Entscheidender Nachteil beim Einsatz der Luciferase ist aber, dass sich dieser Reporter nur in einem Proteingestamtextrakt nachweisen ließe.

Der Einsatz verschiedener Standard-Reporter für die Transfektion von *S. mansoni* ist ein Hinweis darauf, dass für die geringe Expression der Reporter schwache Promotoren verantwortlich sind (Tsien, 1998). Für die Etablierung des Transfektionssystems müssen deswegen weitere konstitutiv stark exprimierende Promotoren kloniert werden.

3.3 Wege zu einer stabilen Transfektion

Die Versuche zur Transfektion von *S. mansoni* bezogen sich in dieser Arbeit bislang auf eine transiente Transfektion adulter Würmer und *in vitro* erzeugter Muttersporozysten. Es wurde nachgewiesen, dass eine transiente Transfektion von *S. mansoni* grundsätzlich möglich ist. Zur Etablierung eines Transfektionssystems sind allerdings weitere Schritte notwendig: Es müssen Konstrukte entwickelt werden, die eine Integration in das schistosomale Genom ermöglichen, um eine stabile Transfektion zu erhalten. Außerdem muss der transgene Organismus in den Lebenszyklus eingebracht werden, weil eine Kultur des gesamten Zyklus *in vitro* ineffektiv ist (Ivanchenko et al., 1999)

Damit Plasmide an die nachfolgende Generation weitergegeben werden, muss die DNA nicht unbedingt in das Genom integriert werden. In *C. elegans* und in humanen Zellen bildet Plasmid-DNA große Konkatomere, die extrachromosomal vererbt werden (Schindelhauer und Laner, 2002; Mello et al., 1991). Die Bildung von Konkatomeren ist unmittelbar abhängig von der transferierten DNA-Menge (Schindelhauer und Laner, 2002; Mello et al., 1991). Wie in 3.1 diskutiert besteht bei Schistosomen das Problem, große DNA-Mengen durch Mikroinjektion zu transferieren, wodurch die Bildung von extrachromosomal vererbaren Konkatomeren unwahrscheinlich ist. Hinzu kommt auch, daß durch extrachromosomale Konkatomere, keine stabile Transfektion erreicht wird, weil diese sich im Laufe der Zeit ausverdünnen.

Eine zeitweilige Blockierung der Genexpression erreicht man in Schistosomen durch RNAi. Aber weder bei der Suppression der Expression des Cathepsin B in Zerkarien (Skelly et al., 2003) noch bei der Suppression der SGTP1 und der GAPDH in Muttersporozysten (Boyle et al., 2003) wurden Phänotypen erzeugt, obwohl die Transkription der betroffenen Gene signifikant um bis zu 80 % reduziert war. In *C. elegans*, wo RNAi-Effekte bislang am besten untersucht wurden, treten Phänotypen

meist erst in der F1-Generation, selten in der F2 und F3-Generation auf (Montgomery et al., 1998; Tabara et al., 1998). Im Unterschied zu *C. elegans* kann der komplexe Lebenszyklus von *S. mansoni* nicht vollständig *in vitro* kultiviert werden, sodass Phänotypen durch RNAi vermutlich schwieriger zu erzeugen sind.

Die Transfektion von Keimzellen und das Einschleusen eines transgenen Stadiums dagegen ermöglicht eine phänotypische Charakterisierung in allen Stadien. Deswegen wurde in dieser Arbeit versucht, eine Transfektion von Keimzellen innerhalb eines Stadiums zu erreichen, das in den Zyklus eingeschleust werden kann.

3.3.1 Transfektion von Keimzellen und Einschleusen eines transgenen Stadiums in den Lebenszyklus

Ein besonderer Vorteil der Transfektion von Schistosomen durch Mikroprojektilbeschusses besteht in der Möglichkeit, die Parameter auf die verschiedenen Stadien anzupassen, sodass sowohl Zellen nahe des Tegumentes aber auch Gewebe im Inneren des Parasiten transfiziert werden können (Davis et al., 1999). Durch Optimierung der Parameter wurden in dieser Arbeit sowohl adulte Würmer als auch Muttersporozysten transient transfiziert.

Adulte Würmer sind aber aus zwei Gründen ungeeignet zur Etablierung eines Transfektionsystems: Die Implantation in die Mesenterialvenen wie sie von Cheever et al. (1994) und Basch und Humbert (1981) beschrieben wurde ist technisch schwer durchzuführen, sodass transgene Würmer nur mit großem Aufwand in den Zyklus integriert werden können. Außerdem besitzen sie nur wenige Keimbahnzellen, die für eine stabile Transfektion erreicht werden müssten, im Verhältnis zu somatischen Zellen.

Auch der Einsatz von Muttersporozysten, die viele totipotente Zellen in den Keimballen besitzen (Pan, 1980), ist in diesem Zusammenhang problematisch: Wie bereits geschildert, ist ihre Kultur *in vitro* nur über einen kurzen Zeitraum möglich (Jourdane und Yoshino, 2000). Die weitere Kultur von Muttersporozysten zu Tochttersporozysten, die notwendig ist für eine Implantation in die Zwischenwirtsschnecken (Jourdane et al., 1985), ist nur in Anwesenheit einer *Bge*-Zelllinie möglich und daher experimentell aufwendig. Eine Implantation bedeutet zudem einen chirurgischen Eingriff für die Schnecken. Die Überlebensrate sowohl für

die Schnecken als auch für die implantierten Sporozysten ist daher gering (Jourdane et al., 1985).

Um ein transgenes Stadium in den Zyklus einzuschleusen, ist es sinnvoll, den natürlichen Infektionsverlauf im Lebenszyklus von *S. mansoni* auszunutzen. Im Lebenszyklus treten zwei freilebende Stadien auf, die Mirazidien, die aus den Eiern schlüpfen und den Zwischenwirt infizieren und die Zerkarien, die von dem Zwischenwirt ausgeschieden werden und den Endwirt infizieren. Zerkarien verlieren mechanisch gestresst leicht ihren Gabelschwanz und sind dann nicht mehr infektiös (Skelly et al., 2003). Mirazidien besitzen außerdem Keimballenzellen, aus denen sich die Sporozysten entwickeln. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Mirazidien transfiziert, mit denen der Zwischenwirt infiziert werden kann.

Nach Anpassung des Mikroprojektilbeschusses zur Transfektion von Mirazidien überlebten 60 % dieses Stadiums den Beschuss und wandelten sich *in vitro* in Muttersporozysten um. In 15 % der sich entwickelnden Muttersporozysten wurden Goldpartikel nachgewiesen. Die Transfektionsrate ist jedoch vermutlich größer, da sich einzelne Goldpartikel nur schlecht nachweisen lassen. Sich bewegende Wimpernzellen in den Protonephridien und peristaltische Bewegungen der Sporozysten zeigten, dass die Transformation der Mirazidien zu Muttersporozysten durch den Mikroprojektilbeschuss nicht beeinflusst wurde. Goldpartikel wurden in unterschiedlichen fokalen Ebenen nachgewiesen. Das bedeutet, dass unterschiedliche Gewebe innerhalb der Sporozyste getroffen wurden.

Um die Transformation beschossener Mirazidien auch *in vivo* zu untersuchen, wurden Mirazidien nach dem Mikroprojektilbeschuss für die Infektion von Schnecken eingesetzt. Unterschiede im Infektionsverhalten im Vergleich zu unbehandelten Mirazidien konnten nicht festgestellt werden. 10 Tage nach der Infektion wurden in den Schnecken Sporozysten nachgewiesen. Die Ansiedlung der Sporozysten in der Nierenregion und die Morphologie der Sporozysten stimmt mit den Beschreibungen aus der Literatur überein (Lemos und Andrade, 2001; Luchtel et al., 1997). Morphologisch ließen sich Sporozysten, die sich aus beschossenen Mirazidien entwickelten, nicht von Sporozysten unterscheiden, die sich aus unbehandelten Mirazidien entwickelten. Die Nukleoli beschossener Sporozysten waren deutlich erkennbar und es konnte Eu- und Hetrochromatin an der Zellmembran

nachgewiesen werden. Die Nukleoli wiesen Vakuolen auf, die ein Hinweis auf eine starke Translationssaktivität sind (Underwood, 1990; Smetana, 1974). In vielen Fällen kolokalisierten Goldpartikel mit den Keimballenzellen. Diese Kolokalisation und die morphologische Integrität zeigen, dass es möglich ist, Mirazidien zu beschießen und für die Infektion von Schnecken einzusetzen.

In dieser Arbeit wurde außerdem nachgewiesen, dass sich aus transgenen Mirazidien transgene Sporozysten innerhalb der Schnecke entwickeln. Der Transfektionserfolg wurde in zwei unabhängigen Versuchen durch den Nachweis von EGFP-Transkripten gezeigt. Der Nachweis von EGFP als Protein gelang vermutlich auf Grund der geringen Expression nicht. In der Positivkontrolle gelang nur der Nachweis von Sporozysten durch ein Infektionsserum aus BALB/c-Mäusen.

Durch den Beschuss von Mirazidien ließe sich ein Transfektionssystem für Schistosomen etablieren, weil sich allein aus den Keimballenzellen in den Muttersporozysten die nächste Generation, die Tochttersporozysten, entwickeln (Jourdane et al., 1980). Die Transfektion von Organellen innerhalb einer Zelle ist bereits in mehreren Studien beschrieben worden (Rohou et al., 2001; Ruf et al., 1997; Butow et al., 1996; Lorito et al., 1993; Klein und Fitzpatrick-McElligot, 1993; Daniell, 1993). Die Keimballenzellen liegen innerhalb des Mirazidiums und können vermutlich nur durch Mikroprojektilbeschuss transfiziert werden. Durch Lipofektion, die vermutlich die Sporozysten weniger schädigen würde, könnten nur Zellen in der Nähe des Tegumentes erreicht werden.

Der Nachweis, dass tatsächlich Keimzellen transfiziert wurden, konnte in dieser Arbeit nicht erbracht werden. In zwei unabhängigen Versuchen konnte in den Zerkarien, die sich aus transfizierten Mirazidien entwickeln, kein EGFP nachgewiesen werden. Der fehlende Nachweis beruht vermutlich auf einer zu geringen Expression des EGFP und weil durch die eingesetzten Plasmide keine Integration in das Genom erfolgt, kommt es vermutlich zu einer Verdünnung der Plasmide. Dadurch wird die ohnehin geringe EGFP-Menge unter die Nachweisgrenze gesenkt. Um eine Keimzellentransfektion nachweisen zu können, müssen stärkere Promotoren eingesetzt werden, die konstitutiv in den Zerkarien aktiv sind oder es müssen Reporter eingesetzt werden, die einen sensitiveren Nachweis ermöglichen.

3.3.2 Integrationen in das schistosomale Genom und Etablierung transgener Linien

Durch den Mikroprojektilbeschuss ist die Menge an DNA, die in die Zellen übertragen wird, bei *S. mansoni* limitiert.

Wie bereits dargestellt ist deswegen die Bildung von extrachromosomalen Konkatameren, die bei *C. elegans* durch Bestrahlung integriert werden können, unwahrscheinlich (Kampkotter et al., 2003).

Eine weitere Möglichkeit zur stabilen Integration stellt die homologe Rekombination dar. Diese direkte Mutagenese von chromosomalen Genloci durch den Austausch mit einem homologen mutierten Gen wird in vielen Systemen zur Transfektion eingesetzt. Die meisten in dieser Arbeit vorgestellten Konstrukte besitzen keine endogenen 3'-Bereiche und sind daher für eine Integration durch homologe Rekombination nicht geeignet. Lediglich das Konstrukt pH-EGFP-H kann mit den endogenen nicht translatierten 5' und 3'-Bereichen des HSP70-Gene dazu eingesetzt werden. Für eine effektive homologe Rekombination sind die nicht translatierten Bereiche in diesem Konstrukt vermutlich zu kurz (Donald und Roos, 1995). Die homologe Rekombination ist ein seltenes Ereignis, sie tritt vor allem in teilungaktiven Zellen auf, in denen nach einem Doppelstrangbruch die eingebrachte DNA mit der chromosomalen DNA rekombiniert (Brenin et al., 1997). Deswegen findet die homologe Rekombination vor allem Anwendung in Transfektionssystemen, in denen durch Elektroporation, Lipofektion oder Mikroinjektion größere DNA-Mengen eingebracht werden können (Mamoun et al., 1999; Donald und Roos, 1998 und 1995; Brenin et al., 1997).

Eine andere Methode zur stabilen Integration ist der Einsatz mobiler genetischer Elemente (MGEs). Diese besitzt gegenüber der homologen Rekombination den Vorteil, dass einmal eingebrachte Konstrukte bis zum Abbau der Plasmid-DNA in der Zelle aktiv sind und dadurch die Insertionshäufigkeit steigt. Mobile genetische Elemente sind in ihrer Aktivität auch nicht auf zellteilungsaktive Zellen fixiert.

Eine Art solcher Elemente sind Transposons. Sie gehören zu den MGEs der Klasse II und sind direkt als DNA im Genom aktiv (Brindley et al., 2003; Finnegan et al., 1989). MGEs der Klasse II wurden bisher nicht in Schistosomen gefunden. Mitglieder der *TC1/mariner*-Superfamilie innerhalb dieser Klasse finden sich aber in Pflanzen, Pilzen und verschiedenen Tierstämmen (Plasterk et al., 1999). Die Transposons

dieser Superfamilie kodieren für eine Transposase, die von *inverted repeats* flankiert wird (Plasterk et al., 1999). Ihre Transposition findet nach einem *cut and paste*-Mechanismus in ein TA Dinukleotid statt (Luo et al., 1998; van Luenen und Plasterk, 1994) und wird allein durch die Transposase ermöglicht (Lampe et al., 1996; Vos et al., 1996). Die bekanntesten Vertreter aus dieser Superfamilie sind *TC1* aus *C. elegans* (Emmons et al., 1983) und *Mos1* aus *Drosophila mauritana* (Medhora et al., 1991; Jacopson et al., 1986). Das *mariner/Mos1* wurde bereits als molekularbiologisches Werkzeug zur Transfektion in verschiedenen Tierstämmen eingesetzt (Bessereau et al., 2001; Mamoun et al., 2000; Wang et al., 2000; Coates et al., 1998; Gueiros-Filho und Beverley, 1997). Es wurde auch ein *mariner*-Transposons in dem Plathelminthen *Dugesia* (Garcia-Fernandez et al., 1995) nachgewiesen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass heterologe *mariner*-Transposons möglicherweise auch im Genom von Schistosomen aktiv sein könnten und daher für eine stabile Transfektion dieses Parasiten eingesetzt werden können (Brindley et al., 2003). Ein erster Schritt zur Überprüfung der Funktionalität des *Mos1/mariner*-Transposon könnten Versuche zur Transposition *in vitro* sein (Goyard et al., 2001; Tosi und Beverley, 2000), in denen der Beweis eines Transpositionsereignisses leichter zu führen ist als *in vivo*. Für *in vivo* Versuche sind starke Promotoren zur Expression der Transposase notwendig, weil die Häufigkeit an Transpositionsereignissen direkt mit der Transposase-Konzentration in der Zelle zusammenhängt (Besserau et al., 2001). Mit integrierenden Konstrukten wäre auch die Weiterentwicklung der RNAi, die für Schistosomen nachgewiesen wurde (Skelly et al., 2003; Boyle et al., 2003), möglich: In *Drosophila melanogaster* wurde durch stabile Integration eines Konstruktes, das bei der Transkription eine doppelsträngige Struktur ausbildet, dauerhaft die Expression eines Transkriptionsfaktors inhibiert (Piccin et al., 2001).

Bei der Etablierung eines Transfektionssystems ist eine Selektion der Transformanten notwendig. Die für parasitische Einzeller (Mamoun et al., 1999; Donald und Roos, 1998) und eukaryotische Zelllinien (Izsvak et al., 2000; Luo et al., 1998; Ivizs et al., 1997) eingesetzten Resistenzgene, die eine Antibiotikaresistenz vermitteln, eignen sich nicht zur Selektion bei *S. mansoni*: Bei der Transfektion von Mirazidien entwickeln sich die transgenen Tochttersporozysten in der

Zwischenwirtsschnecke und sind dort für eine Antibiotikaselektion vermutlich schwer zugänglich. Auf Grund der eingeschränkten Kulturmöglichkeiten ist auch eine Selektion *in vitro* nicht möglich.

Eine weitere Möglichkeit zur Selektion transgener Organismen bietet der Einsatz von GFP als Transfektionsmarker, der eine Detektion *in vivo* ermöglicht. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde EGFP-Expression in *S. mansoni* nachgewiesen, was die grundsätzliche Eignung dieses Reporters als Transfektionsmarker in Schistosomen beweist.

Für das Transfektionssystem von Insekten steht ein *in vivo*-Selektionssystem zur Verfügung: Der artifizielle 3XP3-Promotor, der auf den Promotor des *Pax-6/sine oculis*-Transkriptionsfaktors zurückgeht (Horn und Wimmer, 2000; Czerny und Busslinger, 1995; Wilson et al., 1993), ermöglicht die Expression von EGFP in den Augen verschiedener Insekten-Ordnungen (Wimmer, 2003; Thomas et al., 2002; Kokoza et al., 2001; Horn et al., 2000; Horn und Wimmer, 2000; Berghammer et al., 1999). Dabei ist eine einzige Integration von EGFP unter dem starken Promotor bereits erkennbar (Wimmer, 2003; Berghammer et al., 1999). Das Transfektionssystem ist auch unter der Verwendung des bereits beschriebenen *Mos1/mariner*-Transposon verfügbar (Berghammer et al., 1999). Der Transkriptionsfaktor *Pax-6/sine oculis* nimmt eine zentrale Stellung im regulatorischen Netzwerk ein, das der Augenentwicklung der Metazoa (Pichaud und Desplan, 2002; Callaerts et al., 1997) bei den verschiedenen Rezeptor-Subtypen (Sheng et al., 1997) zu Grunde liegt. Die Augenentwicklung von *Girardia tigrina*, einem Vetreter der Plathelminthen, ist auf molekularer Ebene aufgeklärt und unterliegt ebenfalls dem Transkriptionsfaktor *Pax-6/sine oculis* (Pineda et al., 2002; Callaerts et al., 1999). Für *Girardia tigrina* ist bereits die Verwendbarkeit des Selektionssystems der Insekten beschrieben (Wimmer, 2003). Der Nachweis von *Pax6/sine oculis* ist für *S. mansoni* noch nicht erfolgt. Dennoch ist dieses System möglicherweise auch auf Schistosomen zu übertragen: Für Zerkarien, die als erstes freilebendes Stadium nach der Transfektion von Mirazidien die Zwischenwirtsschnecke wieder verlassen, ist die Existenz von Photorezeptoren morphologisch nachgewiesen worden (Short und Gagne, 1975). Auch auf Transkriptionsebene wurde die Existenz eines an der Photorezeption beteiligten

Proteins nachgewiesen (Santos et al., 1999). Diese Tatsache macht das Vorhandensein einer Regulation durch *Pax-6/sine oculis* und damit die Eignung der vorliegenden Konstrukte zur Selektion von transgenen Zerkarien wahrscheinlich.

Bei der Mutagenese besteht das Problem bei Schistosomen, dass zur Erzeugung von Phänotypen beide Allele des diploiden Organismus mutiert sein müssen. Deswegen sind Kreuzungen von transgenen Schistosomen notwendig. Eine Klonierung von transgenen Schistosomen-Stämmen wäre möglich, indem transgene Zerkarien zur Infektion des Endwirtes eingesetzt und sich entwickelnde Mirazidien einzeln zur Infektion von Schnecken verwendet würden (Den Hollander und Erasmus, 1984). Die sich entwickelnden Zerkarien bilden einen Klon. Für die Infektion des Endwirtes lässt sich das Geschlecht der Zerkarien durch eine PCR-Methode bestimmen (Grevelding et al., 1997).

Neben Klasse II MGEs sind auch mobile genetische Elemente der Klasse I, wie z.B. Retroelemente, die über ein RNA-Intermediat transponieren, für Transfektionsversuche einsetzbar (Kaiser, 2003; Zhu et al., 2003). Diese besitzen eine größere Wirtszellspezifität. Deswegen ist der Einsatz eines endogenen Retroelementes notwendig. *Boudicca* aus *S. mansoni* ist das erste LTR-Retrotransposon, das in seiner gesamten Länge beschrieben ist und in seiner ganzen Sequenz vorliegt. Untersuchungen zu seiner Aktivität im schistosomalen Genom wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

3.3.2.1 Charakterisierung des endogenen Retrotransposons *Boudicca*

Das Genom von *S. mansoni* ist ca. 270 Mb groß (Simpson et al., 1982). Diese Größe entspricht der Genomgröße der anderen humanpathogenen Schistosomen (Hirai et al., 2000; Grossman et al., 1981 a und b). Die Chromosomen von *S. mansoni* werden von zwei Familien an Nicht-LTR-Transposons besiedelt (Drew et al., 1999; Drew und Brindley, 1997), die für Transfektionsversuche nicht eingesetzt werden können. *Boudicca* ist demgegenüber das erste LTR-Retrotransposon, das in seiner gesamten Länge sequenziert und analysiert ist. *Boudicca* nimmt einen relativ großen Anteil am schistosomalen Genom ein, ausgehend von einer Größe von 5,8 kb mit 1000 Kopien macht es ca. 4 % im Genom von *S. mansoni* aus (Copeland et al., 2003). Die *Boudicca*-Kopie im BAC Klon 53-J-5 ist degeneriert und deswegen vermutlich inaktiv. Inaktive Kopien von Retrotransposon können aber durch

vorhandene intakte Kopien an anderer Stelle im Genom aktiviert werden (Wei et al., 2001; Ansari-Lahi und Gibbs, 1996; Chaboissier et al., 1995).

In dieser Arbeit wurden *Boudicca*-Transkripte in adulten Würmern, Sporozysten und Zerkarien nachgewiesen. *Boudicca* ist deswegen vermutlich im Genom von *S. mansoni* aktiv und besitzt auf Grund seines häufigen Vorkommens im Genom möglicherweise einen wichtigen Einfluss auf die Evolution des schistosomalen Genoms (Petrov et al., 2000; Charlesworth et al., 1994). Die von Ivanchenko et al. (1999) nachgewiesenen Transkripte einer reversen Transkriptase können unter anderem auf der Transkription von *Boudicca* beruhen.

Obgleich die vorliegende *Boudicca*-Kopie durch Mutationen inaktiv ist, weist die Integrität der Organisation in ein *gag*- und ein *pol*-gen darauf hin, dass *Boudicca* ein aktives Retrotransposon im schistosomalen Genom ist (Brindley et al., 2003; Copeland et al., 2003). Damit es als molekularbiologisches Werkzeug eingesetzt werden kann, müsste es durch Mutagenese reaktiviert werden.

Eine Aktivierung eines inaktiven MGE ist für das *TC1/mariner*-Transposons *Sleeping Beauty* beschrieben: Durch Ermittlung einer Konsensussequenz aus 12 teilweise bekannten Sequenzen *TC1*-ähnlicher Elemente aus acht verschiedenen Fischarten rekonstruierten Ivics et al. (1997) ein aktives *TC1/mariner*-Transposon, *Sleeping Beauty*, das seine Aktivität in *HeLa*-zellen bewies. *Himar1* aus *Haematobia irritans* wurde auch durch Mutagene reaktiviert (Robertson und Lampe, 1995) und stand nachfolgend für Transfektionsversuche sowohl *in vitro* (Lampe et al., 1998) als auch *in vivo* (Zhang et al., 1998) zur Verfügung.

Mit der Klonierung eines vollständigen *Boudicca*-Transkriptes aus mRNA-Transkripten in dieser Arbeit wurde eine *Boudicca*-Sequenz ermittelt, die einem aktiven Retroelement entspricht und die deswegen als Grundlage für eine Reaktivierung der inaktiven Kopie 53-J-5 dienen kann. Die Ergebnisse der Sequenzierung des *Boudicca*-Transkriptes unterstützten die Vermutung, dass *Boudicca* im Genom von *S. mansoni* aktiv ist: Das *gag*-Gen wird in einem zusammenhängenden ORF kodiert. Das bei nt 999 in der Kopie 53-J-5 vorhandene Stopp-Kodon konnte in den Transkripten nicht nachgewiesen werden. Wichtig für den Einsatz von *Boudicca* als molekularbiologisches Werkzeug ist aber vor allem der Erhalt der Integrase-Domäne innerhalb des zweiten ORF: In der *Boudicca*-Kopie 53-

J-5 bestand die Integrase-Domäne aus mehreren offenen Leserahmen, die durch Stopp-Kodons und Verschiebungen im Leserahmen verursacht wurden. In der Kopie 53-J-5 konnte daher ein 225 bp-Abschnitt innerhalb der Integrase-Domäne nicht zugeordnet werden (Copeland et al., 2003). Die Konsensussequenz aus den Transkripten weist nach, dass es sich bei den Stopp-Kodons bei nt 3923 und bei nt 4167 um Mutationen handelt. Auch die Verschiebung des Leserahmens durch Integration eines Nukleotids bei nt 3577 lässt sich in den Transkripten nicht nachweisen. Die Integrität der Integrase, die eine zentrale Stellung im Lebenszyklus der Retroviren einnimmt (Rice und Baker, 2001; Craigie, 2001; Wlodawer, 1999), weil sie die Integration der retroviralen DNA in die Wirts-DNA ermöglicht (Fujiwara und Mizuuchi, 1988; Craigie und Mizuuchi, 1985), macht deutlich, dass *Boudicca* als Grundlage für ein Vektor-System zur Transfektion von Schistosomen dienen könnte. In mehreren Versuchen gelang keine Amplifikation des dritten ORF, der auf Grund von Sequenzhomologien für ein *envelope*-Protein kodieren könnte (Copeland et al., 2003). Bei *Boudicca* handelt es sich daher um ein Retroelement mit zwei ORF, die für ein *gag*-Gen und ein *pol*-Gen mit den enzymatischen Domänen für eine Protease, eine Reverse Transkriptase, eine RNase H und eine Integrase kodieren. Dieser Aufbau, der durch die Klonierung der aktiven Kopie aus mRNA-Transkripten bestätigt wurde, beweist unter anderem die Verwandtschaft von *Boudicca* zu den Retroelementen *kabuki* aus *Bombyx mori* und *CsRn1* aus *Clonorchis sinensis* innerhalb der *Ty3/gypsy*-ähnlichen LTR-Retrotransposons (Brindley et al., 2003; Copeland et al., 2003).

Die Amplifikation der *gag*-Transkripte aus der cDNA gelang nur mit Primern, die mit dem ATG-Starkodon bei nt 622 hybridisierten. Eine Amplifikation der davor liegenden Sequenzen bis zum Startkodon bei nt 505 war nicht möglich. Wie Analysen der Sekundärstruktur in diesem Bereich gezeigt haben, liegt das Startkodon bei nt 505 innerhalb einer stabilen Sekundärstruktur und ist daher nicht für die reverse Transkriptase zugänglich. Der Nachweis, dass der vollständige Leserahmen, der für das *gag*-Gen kodiert, tatsächlich bei nt 505 beginnt, wird wie bereits erwähnt durch schistosomale ESTs (Zugangsnummern in der Genbank: AI395459 und AI067132), die diesen Bereich überlappen, erbracht. Die reverse Transkription ist ein entscheidender Vorgang bei der Verbreitung der Retroelemente im Wirtsgenom.

Stabile Sekundärstrukturen stellen regulatorische cis-Elemente dar, die abhängig von der reversen Transkriptase und weiteren Transkriptionsfaktoren die Transkription beeinflussen (Brooks et al., 1995). Die Bedeutung solcher cis-Elemente im nicht translatierten 5'-Bereich für die Regulation von Translation, Replikation oder Transkription ist auch von anderen Viren bekannt (Raman et al., 2003; Beuzon et al., 1999; Hemmings-Mieszczak und Hohn, 1999; Suo und Jonson, 1997; Carvalho und Derse, 1991; Feng und Holland, 1988). Diese Regulation ist entscheidend für das Überleben der Retroviren im Genom. Retrotransposons können als genetische Parasiten im Wirtsgenom verstanden werden, die im Laufe der Koevolution Mechanismen entwickelt haben, um das eigene Überleben zu sichern und um ein Überschwemmen des Wirtsgenoms durch Limitierung der eigenen Zahl zu verhindern (Deininger und Batzer, 2002). Die Komplexität dieses Systems wird besonders deutlich am Beispiel der pflanzlichen Pararetroviren, bei denen die Ribosomen durch Transkriptionsfaktoren an sekundären Faltungsstrukturen vorbeigeleitet werden und die Translation an spezifischen AUGs, die abwärts liegen, fortsetzen. Diese Regulation wird als *ribosome shunting* bezeichnet (Hohn et al., 2001).

Die Regulation der Transkription von *Boudicca* geschieht durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren aus der Wirtszelle an das LTR, das ein wesentliches Strukturmerkmal ist. Das *Boudicca*-LTR weist keine signifikanten Homologien zu den LTRs anderer Retrotransposons auf. Es besitzt mit einer Länge von 328 bp eine durchschnittliche Länge innerhalb der LTRs der *Ty3/gypsy*-ähnlichen LTR-Retrotransposons. Das LTR aus *Boudicca* beginnt mit dem Triplet TGT und endet mit dem Triplet TCA. Diese Triplets sind typische Strukturmerkmale der LTR-Retrotransposons und werden als *direct inverted repeats* bezeichnet (Bowen und McDonald, 1999; Dej et al., 1998). In dieser Arbeit wurde überprüft, ob das 5'-LTR der vorhandenen Kopie 53-J-5 *in vitro* als Promotor dienen kann. Das LTR des *human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)* wurde bereits für die Expression von EGFP eingesetzt (Kar-Roy et al., 2000). Basierend auf dieser Studie wurde das LTR von *Boudicca* kloniert und zur EGFP-Expression eingesetzt. Die Expression von EGFP konnte in *HeLa*-Zellen, nicht aber in *cos7*-Zellen nachgewiesen werden. Dies spricht für eine Regulation des LTR durch zelleigene Transkriptionsfaktoren. Für das *HIV1*-

LTR sind zahlreiche Transkriptionsfaktoren bekannt (Wahlers et al., 2002; Kar-Roy et al., 2000). Das LTR von *Boudicca* enthält zwei TATA-Boxen und eine CCAAT-Box. Die TATA-Box ist ein kritischer Faktor für die basale Transkription des *HIV1*-Virus (Kashanchi et al., 1994; Berkhout und Jeang, 1992). TATA-Boxen und CCAAT-Boxen sind aber vermutlich nicht für die zellspezifische Aktivierung verantwortlich, weitere Erkennungssequenzen wie sie für das *HIV1*-LTR beschrieben sind, konnten dem *Boudicca*-LTR aber nicht zugeordnet werden. Zellspezifische Aktivität ist bei Retroviren sehr verbreitet (Wahlers et al., 2002; Derse et al., 1985). Insgesamt ist die Aktivität des *Boudicca*-LTR als Promotor ein weiterer Beweis für die Integrität dieses Retroelementes aus *S. mansoni* und seine Aktivität im schistosomalen Genom. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die vorliegende *Boudicca*-Kopie 53-J-5 nach ihrer Reaktivierung durch Mutagenese als Grundlage für die Herstellung von Vektoren zur stabilen Transfektion von *S. mansoni* dienen könnte.

4 Ausblick

Für die geringe Expression der Reporter in meinen Transfektionsexperimenten ist vermutlich die geringe Aktivität der in den Konstrukten vorliegenden Promotoren verantwortlich. Dennoch wäre die Quantifizierung der Transkription der verschiedenen Reporter in den Schistosomen durch quantitative *Real Time PCR* sinnvoll. Dadurch könnte abschließend geklärt werden, ob die geringe Reporterexpression auf eine geringe Transkription oder Translation zurückzuführen ist.

In etablierten Transfektionssystemen werden oft Promotoren des Cytoskeletts für die Expression von Reportern eingesetzt. Auch in dieser Arbeit wurde versucht, eine starke Expression durch einen Aktinpromotor zu erhalten. Der vorhandene Aktinpromotor führte aber zu keiner Verbesserung der Reporterexpression, da der klonierte Aktinpromotor vermutlich reguliert ist. Die Klonierung von Promotoren von Cytoskelettproteinen sollte in weiteren Versuchen für eine starke Reportergenexpression durchgeführt werden. Da viele Cytoskelettproteine Proteinfamilien angehören, ist es notwendig, die Expressionsmuster der Aktine, der Myosine oder der Paramyosine aufzudecken, wie das für *C. elegans* geschehen ist. Damit wäre dann die Klonierung von starken *house-keeping* Genen möglich. Es ist auch notwendig, *enhancer* von Schistosomen zu klonieren bzw. größere Bereiche des nicht translatierten 5'-Bereichs mit mehr regulierenden Bereichen aus genomischer DNA zu erhalten. Um in der Zukunft die Transfektionseffizienz zu optimieren, sollten Promotoren von Genen, die in hoher Kopienzahl in ESTs-Analysen gefunden werden, kloniert werden, da die Anzahl an gefundenen Kopien einen Hinweis auf die tatsächliche Expressionsstärke zulässt. Für die Expression von Reportern in Zerkarien wäre z.B. an den Promotor der GAPDH zu denken. Ein weiteres Problem bei der Transfektion von Schistosomen besteht in der Regulation der Expression in den verschiedenen Stadien. Bei der Wahl der Promotoren muss daher beachtet werden, welches Stadium transfiziert werden soll. Sollen z.B. integrierende Konstrukte in Schistosomen exprimiert werden, ist die Expression dieser Konstrukte durch Promotoren, die stark in Sporozysten exprimieren, notwendig. Die Expression eines Reporters zur Selektion transgener Zerkarien dagegen muss für Zerkarien optimiert sein. Der HSP70-Promotor ist z.B. in diesem

Zusammenhang ungeeignet, weil er in Zerkarien inaktiv ist. Möglicherweise muss mit verschiedenen Konstrukten kotransfiziert werden.

Unter Umständen reicht die gezeigte schwache Expression bereits aus, um eine stabile Integration in das schistosomale Genom zu erreichen. In ersten Ansätzen wäre es sinnvoll, DNA-Transposons für die stabile Transfektion einzusetzen: In *Dugesia*, einem Trematoden, wurde ein *mariner* ähnliches Transposon gefunden, was darauf hindeutet, dass diese Transposons auch in Schistosomen aktiv sind. Sinnvoll wäre z.B. der Einsatz des *mos1/mariner* Transposons für die stabile Transfektion in Schistosomen, weil sich gerade dieses Transposon durch eine weite Wirtsspezifität auszeichnet.

Auch *Boudicca* ist für eine solche stabile Transfektion geeignet, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, weist die vorhandene Kopie wenige Mutationen auf und ließe sich vermutlich reaktivieren. Vor allem die für die Integration notwendige Integrase weist eine intakte Struktur auf. Der Vorteil von Viren oder Retroelementen läge auch in einer hohen Transfektionsrate. Die Transfektion von Mirazidien durch Mikroprojektilbeschuss scheint als Methode geeignet zu sein, ein transgenes Stadium in den Zyklus einzuschleusen.

5 Methoden und Materialien

5.1 Methoden

5.1.1 Methoden zur Haltung von *Schistosoma mansoni*

5.1.1.1 Experimenteller Lebenszyklus

Der Laborzyklus von *S. mansoni* wurde in der Maus *Mus musculus* Stamm BALB/c sowie der Wüstenrennmaus *Meriones unguiculatus* als Endwirt und der Wasserlungenschnecke *Biomphalaria glabrata* als Zwischenwirt etabliert. Die Endwirte wurden in Makrolonkäfigen im institutseigenen Tierhaus mit einem Hell-Dunkelrhythmus von 12 h gehalten. Der Zwischenwirt wurde bei 28°C unter Sprudelbelüftung in Wasser zur Schneckenhaltung (5.2.18) mit einem Hell-Dunkelrhythmus von 12 h kultiviert. *B. glabrata* wurde mit 10-20 Mirazidien pro Schnecke, die aus isolierten Schistosomeneiern (5.1.1.3) schlüpften, über Nacht unter einer Lichtquelle in 20 ml Wasser inkubiert. Nach 26 Tagen Kultur unter Standardbedingungen wurden die so infizierten Schnecken für 48 h abgedunkelt. Die Zerkarienausscheidung wurde induziert, indem die Schnecken verteilt auf 12-Loch-Platten starkem Licht ausgesetzt wurden; nach 2 h ließ die Zerkarienausscheidung nach und die Schnecken wurden entfernt. Die Zerkarien von mindestens 5 ausscheidenden Schnecken wurden vereinigt, um zu gewährleisten, dass männliche und weibliche Zerkarien für die Infektion des Endwirtes eingesetzt wurden. Die Tiere, die als Endwirte dienten, waren zum Zeitpunkt der Infektion mindestens 10 Wochen alt. Die zuvor durch Metofane-Inhalation betäubten Tiere wurden je nach Art mit 70-100 Zerkarien, die zuvor unter dem Binokular ausgezählt und in Spritzen in max. 0,1-0,3 ml Wasser aufgezogen wurden, infiziert. Die Infektion erfolgte durch subkutane Injektion von 70 Zerkarien in die Wüstenrennmäuse und von 100 Zerkarien in die Mäuse.

5.1.1.2 Gewinnung und *in vitro*-Kultur adulter Würmer

Zur Isolation von Würmern aus infizierten Endwirten wurden die Tiere 42 Tage nach ihrer Infektion durch CO₂-Inhalation getötet. Nach dem Öffnen der Bauchdecke wurden die Würmer durch vorsichtige Injektion von 50 ml 1 x PBS in den linken Herzventrikel aus den Mesenterialvenen herausgespült und konnten aus dem Bauchraum gesammelt werden. Die adulten Würmer wurden mehrfach mit sterilem

RPML komplett gewaschen und bei 37°C und 5 % CO₂ unter sterilen Bedingungen bis zu 14 Tagen kultiviert. Da die weiblichen Würmer auf Grund starker Eigenfluoreszenz für Transformationsversuche ungeeignet waren, wurden Wurmpaare durch Inkubation für 15 min bei 4°C getrennt.

5.1.1.3 Gewinnung von Schistosomeneiern, Mirazidienschlupf und Sporozystenkultur

Schistosomeneier wurden aus Lebern infizierter Endwirte nach der Methode von Coustau et. al (1997) gewonnen. Die frisch entnommenen Lebern wurden durch ein Sieb gepresst und homogenisiert. In einem Erlenmeyerkolben wurde das Homogenat drei- bis fünfmal mit 200 ml kalter 1,8 %iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt und auf Eis für 15 min inkubiert. Der Überstand wurde verworfen. Abschließend wurde einmal mit Wasser gewaschen, um die NaCl-Lösung zu entfernen. Die isolierten Eier mit den verbliebenen Leberbestandteilen wurden in einen 50 ml Messzylinder überführt. Der Messzylinder wurde mit 28°C warmen Wasser aufgefüllt und in ein gleichwarmes Wasserbad gestellt. Der Zylinder war bis auf einen Rand am oberen Ende durch Aluminiumfolie abgedunkelt. Das Schlüpfen der Mirazidien aus den Eiern wurde durch Inkubation für 2-4 h unter dem starken Licht einer Kaltlichtlampe induziert. Geschlüpfte Mirazidien sammelten sich an der Wasseroberfläche im Licht. Der gesamte Überstand wurde aus dem Messzylinder in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und nachfolgend für 15 min auf Eis abgekühlt, um die Mirazidien zu konzentrieren. Eine anschließende Zentrifugation für 3 min bei 1000 Umdrehungen/Minute (rpm) ließ alle Mirazidien absinken. Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgenommen und die Mirazidien erneut für 15 min unter Licht bei 28°C inkubiert. Der Überstand mit den freibeweglichen Mirazidien wurde in Kultur genommen. Zur Transformation in Muttersporozysten wurden die aufgereinigten Mirazidien auf eine 12-Loch-Platte verteilt. Die Transformation in Muttersporozysten wurde durch Zugabe von Sporozystenkulturmedium MEMSE-J (Kawanaka et al., 1986) induziert. Die vollständige Transformation erfolgte bei 28°C und 5 % CO₂ im Inkubator innerhalb von 24 h. Sporozysten, die für die Mikroinjektion eingesetzt wurden (5.1.2.1) wurden weitere 24 h kultiviert. Durch eine Zentrifugation für 2 min bei 1000 rpm wurden die Sporozysten aus der Kultur isoliert. Der Überstand wurde abgenommen und die Sporozysten konnten nun in dem verbliebenen kleinen Volumen pipettiert werden.

5.1.2 Methoden zur genetischen Transformation von *S. mansoni*

5.1.2.1 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion bietet den Vorteil des gezielten Transfers von DNA in einzelne Zielzellen und kann mikroskopisch verfolgt werden. Sie wurde unter einem Inversmikroskop (Axiovert 135, Zeiss) mit Hilfe eines Mikromanipulators (Leitz, Wetzlar) und eines Mikroinjektors (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Injektionsnadeln wurden hergestellt, indem Glaskapillaren mit Filament (Außendurchmesser: 1 mm; Innendurchmesser: 0,58 mm) mit Hilfe eines Ausziehgerätes für Glasnadeln (Kopf Instruments, USA) ausgezogen und so auf einen Innendurchmesser von 0,2-0,35 μ m begrenzt wurden. Haltenadeln wurden hergestellt, indem Glaskapillaren ohne Filament (Außendurchmesser 1 mm, Wandstärke 0,125 mm) über einem Bunsenbrenner von Hand ausgezogen wurden und so der Innendurchmesser auf 5-10 μ m begrenzt wurde. Die Injektionsnadel wurde beladen, indem sie mit der stumpfen Seite in die Injektionslösung gestellt wurde. Als Injektionslösungen wurden Trypan-Blau und DNA-Lösungen mit einer Konzentration von 2,25 μ g/ μ l in 1 x Mikroinjektionspuffer verwendet. Die Injektionslösung wurde auf Grund von Kapillarkräften in die Nadel eingesaugt. Die Sporozysten wurden unmittelbar vor der Injektion für 10 min auf Eis inkubiert, um ihre Beweglichkeit einzuschränken. Die Mikroinjektion erfolgte auf Objektträgern mit Hohlschliff (Roth, Karlsruhe), in welche die Sporozysten in 20 μ l Medium eingebracht und anschließend mit Paraffinöl überschichtet wurden. Eine Sporozyste wurde mit einer Haltenadel vom Boden gelöst und so positioniert, dass ein Keimballen unmittelbar an der Öffnung der Haltenadel zu liegen kam. Jetzt konnte die Injektionsnadel mit Hilfe des Mikromanipulators auf die Höhe der Sporozyste gebracht werden. Injiziert wurde, indem die Injektionsnadel in die Öffnung der Haltenadel geführt wurde und anschließend wieder ein kleines Stück zurückgezogen wurde, sodass ihre Spitze in dem Keimballen ruhte. Eingebracht wurde etwa 1/10 μ l Lösung bei einem Druck von 4000 Psi. Nach der Mikroinjektion wurden die Sporozysten bei 28°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 48 h wurde die Reporterogenaktivität mikroskopisch untersucht.

5.1.2.2 Elektroporation

Bei der Elektroporation werden Zellmembranen durch das Anlegen einer elektrischen Spannung reversibel elektrisch permeabilisiert, sodass DNA in die Zelle eindringen

kann. Die Elektroporation von Sporozysten wurde mit dem Elektroporator BTX ECM 830 (Qbiogene, Heidelberg) in 4 mm Elektroporationsküvetten (peqLab, Erlangen) durchgeführt. Ca. 500 Sporozysten wurden in einem Gesamtvolumen von 700 μ l 1:3 verdünnten MEMSE-J für 10 min bei Raumtemperatur (RT) mit 10-50 μ g DNA in Elektroporationsküvetten inkubiert. Elektroporiert wurde bei einer Feldstärke von 910 V/cm mit einem Puls von 250 μ s und bei einer Feldstärke von 660 V/cm mit zwei Pulsen von 250 μ s. Nach der Elektroporation wurden die Sporozysten zur Regeneration 10 min bei RT in den Küvetten belassen und danach für 48 h bei 28°C kultiviert. In einem weiteren Versuch zur Elektroporation wurden die Sporozysten nach der Methode von Neumann et al. (1996) in Anwesenheit von DEAE-Dextran in einer Konzentration von 3,1 μ g/ μ l elektroporiert. Propidiumiodid wurde in einer Endkonzentration von 15 mg/ml (Sersa et al., 1995; Gabriel und Teissie, 1997) eingesetzt, um die Transfektion mikroskopisch mitzuverfolgen. Propidiumiodid fluoresziert bei einer Anregungswellenlänge von 546 nm (Grünlicht) orange-rot und ermöglichte eine direkte Untersuchung des Transfektionserfolgs ohne auf die Expression des Reportergens warten zu müssen.

5.1.2.3 Mikroprojektilbeschuss

Bei dieser Methode wird DNA auf Goldpartikel präzipitiert. Die Goldpartikel werden als Projektile genutzt und mit Hilfe von Druck gegen das Untersuchungsobjekt beschleunigt (Abb. 5.1). Der Druck wird bei der heliumbetriebenen Apparatur mit Hilfe von Helium hinter einer Plastikscheibe (*Rupture Disk*) aufgebaut, die je nach gewählter *Rupture Disk* bei Drücken von 900-2200 Psi zerreißt. Durch die Wahl der *Rupture Disk* lässt sich der aufgebaute Heliumdruck je nach Versuchsobjekt variieren. Durch einen größeren Heliumdruck beschleunigte Goldpartikel dringen tiefer in die zu transfizierende Probe ein und ermöglichen die Transfektion tiefer gelegener Zellschichten oder die Transfektion von Objekten mit einer härteren Oberfläche.

Der Mikroprojektilbeschuss wurde in dieser Arbeit zur Transfektion von adulten männlichen Würmern, von Sporozysten und von Mirazidien eingesetzt. Die adulten Würmer wurden in die Mitte einer 6 cm Petrischale pipettiert und das Medium entfernt. Auch Sporozysten wurden in 6 cm Petrischalen transfiziert. Das Entfernen des Mediums geschah unter dem inversen Mikroskop. Mirazidien wurden zur Transfektion auf die Polycarbonatmembraneinlage einer 12 cm Kulturschale

(Costar, Bodenheim) pipettiert. Wasser floss durch die semipermeable Membran ab, sodass die Mirazidien auf der Membran trocken fielen. Um eine effiziente Transfektion zu erzielen, wurden adulte Würmer, Sporozysten und Mirazidien auf einer maximalen Fläche von 0,5 cm Durchmesser aufgebracht. Die gelieferten Goldpartikel mit einer Größe von 1 μm (Biorad, München) mussten vor dem Gebrauch gewaschen werden: Basierend auf der Methode von Sanford et. al (1993) wurden 30 mg Goldpartikel in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß eingewogen und in 1 ml 70 % Ethanol für 5 min stark gevortext und anschließend für 15 min bei RT inkubiert. Die Goldpartikel wurden kurz 5 sec abzentrifugiert und der Ethanol abgenommen. Folgender Vorgang wurde dreimal wiederholt, um die Goldpartikel von dem Ethanol zu befreien: Zugabe von 1 ml sterilen Wassers, 1 min Inkubation bei RT, 1-2 sec Zentrifugation, Abnehmen des Überstandes. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Goldpartikel in 50 % sterilen Glycerols aufgenommen. Die Goldpartikelsuspension mit einer Konzentration von 60 mg/ml wurde bei 4°C aufbewahrt.

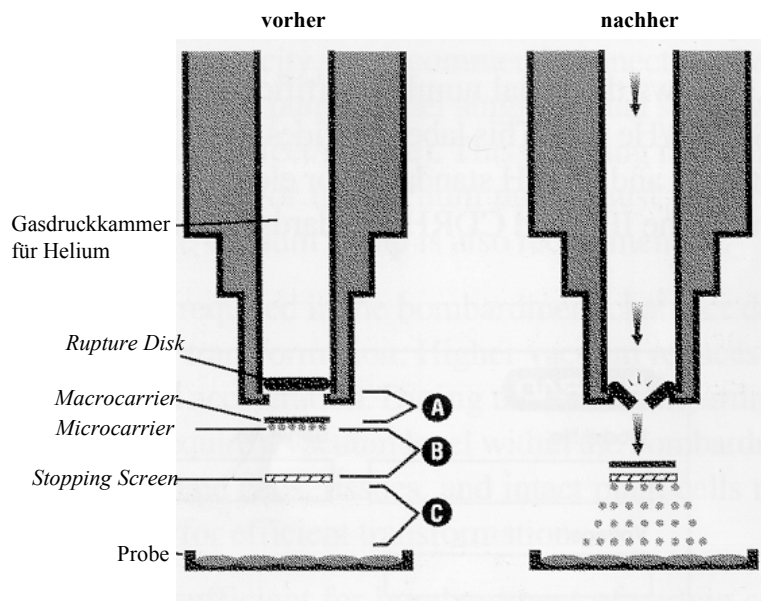


Abb. 5.1: Ablauf des Mikroprojektil-Beschusses. Helium sammelt sich in einer Druckkammer hinter der *Rupture Disk*, die bei einem definierten Druck zerreißt. Die Helium-Druckwelle beschleunigt die auf einer Plasticscheibe (*Macrocarrier*) heftenden Goldpartikel (*Microcarrier*), die zuvor mit DNA beladen worden waren, gegen die Probe. Ein Metallsieb (*Stopping Screen*) hält den *Macrocarrier* zurück und lässt nur die *Microcarrier* passieren. A: variabler Abstand zwischen *Rupture Disk* und *Macrocarrier*; B: variabler Abstand zwischen *Macrocarrier* und *Stopping Screen*; C: variabler Abstand zwischen *Stopping Screen* und Probe. In dieser Arbeit wurde für A ein Abstand von 3-5 mm, für B der durch Unterlegscheiben bestimmbare mittlere Abstand von ca. 10 mm und für C der kleinste mögliche Abstand von 3 cm gewählt. (Die Zeichnung wurde verändert nach Biorad, München.)

Für einen Beschuss wurden 0,5 mg Gold und 5 μ g DNA eingesetzt. Zur Beladung der Goldpartikel mit DNA wurde die Goldsuspension zunächst 5 min stark gevortext. 8,5 μ l Goldsuspension wurden unter leichtem Vortexen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden rasch 5 μ g DNA in einem Volumen von 5-15 μ l, 8,5 μ l 2,5 M CaCl_2 und 3,5 μ l 0,1 M Spermidin hinzugefügt. Der Ansatz wurde für ca. 2 min gevortext. Nach dem Vortexen wurden die Goldpartikel für 1 min stehen gelassen, damit sie sich am Boden sammelten. Der Überstand wurde abgenommen. Nachfolgend wurde das Gold zweimal mit 96-100 % Ethanol gewaschen und in 15 μ l 96-100 % Ethanol aufgenommen. Die Goldsuspension wurde leicht gevortext, durch Pipettieren resuspendiert und auf die *Macrocarrier* übertragen. Der Überstand wurde abgenommen und das Gold trocknete unter der Sterilbank. Zur Optimierung der Methode wurden Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) gelabelte Oligonukleotide (MWG Biotech, Ebersberg) anstelle von DNA eingesetzt. FITC fluoresziert bei Grünlichtanregung gelb-grün und ermöglichte eine direkte Untersuchung des Transfektionserfolges ohne auf die Expression des Reportergens warten zu müssen. Der Beschuss fand unter Vakuum (15 mm Quecksilbersäule) statt. Adulte Würmer wurden innerhalb weniger Minuten zweimal bei einem Druck von 1800 Psi mit dem gleichen Konstrukt beschossen. Sporozysten wurden zunächst mit einem Druck von 1500 Psi und nach Optimierung der Methode mit einem Druck von 900 Psi beschossen. Mirazidien wurden mit einem Druck von 900 Psi beschossen. Nach dem Beschuss wurden adulte Würmer bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert, Sporozysten bei 28°C und 5 % CO_2 , Mirazidien wurden entweder zur Infektion von Zwischenwirtsschnecken (5.1.1.1) eingesetzt oder *in vitro* in Sporozysten transformiert (5.1.1.3). Zur Induktion eines Hitzeschocks wurden adulte Würmer 24 h nach der Transfektion für 4 h bei 42°C und danach für weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Sporozysten wurden nicht hitzegeschockt. Mikroskopische, molekularbiologische oder biochemische Untersuchungen erfolgten 48-72 h nach der Transfektion.

5.1.3 Molekularbiologische Methoden

5.1.3.1 Kultur und Lagerung von *Escherichia coli*

5.1.3.1.1 Flüssigkultur und Kultur auf Agar-Festplatten

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurde LB-Medium steril mit einer isolierten *E. coli*-Kolonie von einer Agarplatte angeimpft. Zur Selektion auf das Vorhandensein des Plasmids wurde der Kultur das dem Plasmid entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Die Endkonzentration für Ampicillin betrug 100 µg/ml, die für Kanamycin 50 µg/ml. Die Kulturen wurden in einem Schüttler bei 37°C und 230 rpm über Nacht inkubiert. Die Plasmidausbeute bei der DNA-Präparation wurde erhöht, indem die Übernachtskultur durch Verdünnen einer 3 ml-Vorkultur im Verhältnis 1:250 bis 1:500 in frischem Medium angesetzt wurde. Die Vorkultur war ihrerseits aus einer Einzelkolonie oder durch Überimpfen von Zellen aus einer Gefrierkultur angeimpft worden und dann für 4 h bis 8 h bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert worden. Zur Isolation einzelner Klone wurden *E. coli*-Zellen auf LB-Agarplatten (mit dem entsprechenden selektiven Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.1.3.1.2 Glycerin-Gefrier-Kulturen

Für die dauerhafte Aufbewahrung von *E. coli*-Zellen bei -80°C wurden 920 µl einer 3 ml-Kultur, die über Nacht gewachsen und von einer Einzelkolonie angeimpft worden war, mit 80 µl sterilen Glycerins (87 %) versetzt und kurz gevortext. Diese Kulturen wurden dann sofort in flüssigem Stickstoff inkubiert. Während des raschen Einfrierens wurde eine Schädigung der *E. coli*-Zellen durch das Glycerin verhindert.

5.1.3.2 Isolation von RNA

Die Isolation von RNA aus Zellkultur-Zellen und Parasiten wurde mit dem Materialsatz RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Isolation von RNA aus Zellen wurden 3×10^6 cos7-Zellen oder 7×10^6 HeLa-Zellen eingesetzt, zur Isolation von RNA aus Schistosomen wurden 20 adulte Würmer, 500-1000 Sporozysten oder 1000-2000 Zerkarien verwendet. Zur Vermeidung von RNase Kontamination der Proben wurden sämtliche Geräte vor der Verwendung mindestens 4 h bei 240°C sterilisiert und Lösungen mit DEPC behandeltem Wasser und frischen Chemikalien angesetzt. Parasiten-Material wurde nach der Aufnahme in den Lysis-Puffer zunächst mechanisch mit einem kleinen Pistill und unter mehrfachem Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff

mechanisch zerkleinert. Das Homogenisieren der Proben erfolgte dann mit QIAshredder-Säulchen (Qiagen, Hilden). Die RNA wurde nach ihrer Isolation in 50 ml DEPC-Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert.

5.1.3.3 Verdau mit RNase freier DNase

50 μ l RNA wurden vor ihrem Umschreiben in cDNA mit 2 μ l RNase freier DNase (Stratagene, Heidelberg) bei 37°C für 3 h inkubiert, zur Stabilisierung der RNA wurden 2 μ l RNase Block (Stratagene, Heidelberg) dem Ansatz zugefügt.

5.1.3.4 Umschreiben der RNA in cDNA

Die in der Gesamt-RNA vorhandene mRNA wurde mit Hilfe der M-MLV Reversen Transkriptase (H-) (Promega, Mannheim) in cDNA umgeschrieben.

In einen 20 μ l Ansatz wurden folgende Komponenten pipettiert:

1 μ l Oligo(dT)12-18 (0,5 μ g/ μ l)

1-5 μ g Gesamt-RNA

ad 12 μ l DEPC-Wasser

Nach Mischen und anschließender Inkubation für 10 min bei 70°C wurde der Ansatz für 2 min auf Eis schnell abgekühlt und nachfolgend abzentrifugiert. Danach wurden dazu gegeben:

4 μ l 5 x First Strand Puffer

2 μ l 0,1 M DTT

1 μ l 10 mM dNTP-Mix (in DEPC-Wasser)

1 μ l RNase Block

Der Ansatz wurde wiederum gemischt und für 2 min bei 42°C inkubiert, die nachfolgende Transkription der RNA in cDNA erfolgte nach Zugabe von 1 μ l Transkriptase für 50 min bei 42°C. Transkriptase und RNase Block wurden dann durch Inkubation des Ansatzes für 20 min bei 70°C inaktiviert.

5.1.3.5 Isolation von genomischer DNA

Genomische DNA aus adulten Schistosomen wurde mit dem DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert: 10-25 adulte Würmer wurden enzymatisch durch Inkubation mit Proteinase K aufgeschlossen. Durch Zugabe von chaotropen Salzen wird die Hydrathülle der DNA zerstört, sodass diese an die Silikamembran der Säulen bindet. Die Elution erfolgte in 50-100 μ l Wasser.

5.1.3.6 Isolation von Plasmid-DNA

Minipräparationen von Plasmid-DNA zur anschließenden Restriktionsanalyse wurden nach der Methode von Willimzig (1985) durchgeführt. 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert und das Bakterien-Pellet in 125 µl TELT-Lösung (Tris/HCl; EDTA; LiCl; Triton X-100), der Lysozym in einer Konzentration von 5 mg/ml zugesetzt war, durch starkes Vortexen vollständig resuspendiert und für 15-20 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben 3 min bei 95°C erhitzt und 5 min auf Eis abgekühlt. Nachdem die Probe 15 min bei 10000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert worden war, wurde das Pellet mit sterilen Zahnstochern entfernt. Der Überstand wurde mit 300 µl 100 % Ethanol versetzt. Nach 5 Minuten Inkubation bei RT wurden die Proben wiederum bei 10000 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet mit 200 µl 70 % Ethanol (v/v) gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 50 µl Wasser aufgenommen. Zur vollständigen Resuspension der Pellets wurde Plasmid-DNA kurz gevortext. RNA wurde durch Zugabe von RNase A in den Restriktionsansatz verdaut. Zur Isolation von hochreiner DNA bzw. zur Aufreinigung großer Mengen an DNA für Sequenzierung, Transformation und Transfektion wurden kommerziell erhältliche Säulen (Clontech, Heidelberg) verwendet. Grundlage dieses Verfahrens ist das Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979), das modifiziert und zur Aufreinigung der DNA mit Anionenaustauschersäulchen, die als Ladungsträger gereinigtes Silicat enthalten, kombiniert wurde. Bei Einsatz eines high-copy-Plasmids konnten so bei der Präparation einer 25 ml Kultur (Midi-Präp) bis zu 100 µg und bei der Präparation einer 100 ml Kultur (Maxi-Präp) bis zu 500 µg Plasmid-DNA gewonnen werden.

5.1.3.7 Restriktion von DNA

Zur Restriktion wurden pro µg DNA 3 Units Restriktionsendonuklease eingesetzt. Die Restriktion erfolgte in dem mitgelieferten 10 x Reaktionspuffer nach Angaben des Herstellers für 1-3 h. Weil das im Enzympuffer enthaltene Glyzerin die Restriktion störte, durfte die Menge an Enzym max. 10 % der Gesamtmenge betragen. Bei Verdau mit zwei verschiedenen Enzymen in dem gleichen Puffer betrug die Aktivität beider Enzyme mindestens 50 % laut Hersteller. Die Restriktionsendonukleasen wurden anschließend durch Hitzeinaktivierung deaktiviert oder durch Phenol-Chloroform-Fällung oder Auftrennung im Agarosegel entfernt.

5.1.3.8 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach einer Restriktion und zur Aufreinigung von DNA wurden Agarosegele von 0,7-1,5 %, denen zur späteren Visualisierung unter UV-Licht Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt war, in einer horizontalen Gelapparatur verwendet. Je nach Größe der Gele erfolgte die Auftrennung bei einer Spannung zwischen 60 und 100 V. Die Proben wurden mit 6 x Probenpuffer versetzt. Der Probenpuffer enthielt neben Glycerin, das ein Absinken der Probe in die Geltasche bewirkt, einen blauen Farbstoff, der den Fortgang der Elektrophorese auf dem Gel beobachten ließ. Zur Beurteilung der Größe der DNA-Fragmente diente der 1 kb-DNA-Leiter (Rapidozym, Berlin) und der SmartLadder DNA-Marker (Eurogentec, Belgien). Zur Dokumentation wurden die Gele nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA in der Geldokumentationsanlage im UV-Licht von einer Kamera aufgenommen. Die Bilder wurden von einem Fotoprinter ausgedruckt oder zur späteren Bildverarbeitung auf Diskette abgespeichert.

5.1.3.9 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Nach vollständiger Auftrennung des Restriktionsansatzes konnte die Bande, in der das erwünschte Fragment lief, durch Vergleich mit den Banden des Größenmarkers ermittelt und mit Hilfe eines gereinigten Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten werden. Die DNA wurde nur kurz dem zur Visualisierung notwendigen UV-Licht ausgesetzt, um eine Schädigung zu verhindern. Die Isolation der DNA aus dem Gel wurde mit Hilfe des NucleoSpin Extraction Kit (Clontech, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach dem Schmelzen der Agarose wurde die DNA über Säulchen mit Silikamembran aufgereinigt.

5.1.3.10 Reinigung und Fällung von RNA und DNA

Kontaminierende Proteine wurden durch Phenol-Chloroform-Extraktion nach Sambrook et al. (1989) entfernt: Die Probe wurde mit einem Volumen Roti-Phenol-Chloroform-Gemisch (Roth, Karlsruhe) versetzt. Nach gründlichem Vortexen und Zentrifugation für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit wurde die wässrige Phase mit der RNA oder DNA abgenommen. Verbliebene Phenolreste wurden mit einem Volumen (Vol) Chloroform-iso-Amylalkohol ausgewaschen. Nachfolgend wurde die RNA oder DNA durch Zugabe von 0,1 Vol Natriumacetat, pH 5,2 und 2,5 Vol 100 % Ethanol bei 4°C für mehrere Stunden gefällt. Danach wurde der

Fällungsansatz bei 14000 rpm und 4°C für 30 bis 60 min zentrifugiert. Nach dem Waschen mit 70 % Ethanol wurde das RNA-oder DNA-Pellet getrocknet. RNA wurde in DEPC-Wasser gelöst. Alternativ wurde RNA durch Zugabe von 1 Vol Isopropanol bei 4°C für mehrere Stunden gefällt. PCR-Fragmente wurden mit dem NucleoSpin Extraction Kit (Clontech, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers aus dem PCR-Reaktionsansatz isoliert.

5.1.3.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration an Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm, bei der Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum besitzen, bestimmt. Bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht die optische Dichte OD₂₆₀ von 1 50 µg doppelsträngiger DNA, 40 µg einzelsträngiger DNA bzw. RNA und 20 µg einzelsträngiger Oligonukleotide (Sambrook et al., 1989). Verunreinigungen mit Proteinen wurden durch eine zweite Messung bei 280 nm nachgewiesen, da die aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin und Tryptophan bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum besitzen. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ liegt bei einer proteinfreien Nukleinsäurelösung zwischen 1,8 und 2 (Sambrook et al. 1989).

5.1.3.12 Glätten von 5'-überhängenden Restriktionsschnittstellen

Aus 5'-überhängenden Restriktionsschnittstellen können durch Auffüllen glatte Enden erzeugt werden. Dazu wird die DNA in Anwesenheit von dNTPs mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* inkubiert.

Folgender Reaktionsansatz wurde pipettiert.

1-10 µg DNA in max. 10 µl

2 µl 10 X Klenow-Puffer

1 µl dNTP-Mix (10mM)

1 µl Klenow-Fragment

H₂O ad 20 µl

5.1.3.13 Dephosphorylierung

Zur Verhinderung der Selbstligation von DNA-Fragmenten wurden die terminalen 5'-Enden durch die alkalische Kälberphosphatase abgespalten. Die DNA wurde in einer Konzentration von 0,5 µg/10 µl in 1 x Reaktionspuffer verdünnt. Pro µg Vektor wurden 0,5 Einheiten alkalische Phosphatase dazugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert.

5.1.3.14 Ligation

Bei der Ligation werden die bei der Restriktion entstandenen freien 5'-Phosphatenden durch Inkubation mit der T4-Ligase kovalent unter ATP-Verbrauch mit den freien 3'-Hydroxylenden verknüpft. Zur Ligation wurden 250 ng Vektor-DNA im molaren Verhältnis 1:3 mit dem zu ligierenden DNA-Fragment in einem Gesamtvolumen von 10-15 µl eingesetzt. Die Ligation fand unter Einsatz von 1 Einheit T 4-DNA-Ligase in 1 x Ligasepuffer statt. Ligiert wurde für mehrere Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C.

5.1.3.15 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach der Methode von Inoue et. al (1990) hergestellt. In 200 ml LB-Medium wurden *E. coli*-Bakterien bis zu einer Dichte von 0,6 OD₆₀₀ kultiviert. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wurden die Bakterien für 10 min bei 4°C und 2500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 80 ml kaltem TB-Puffer aufgenommen. Nach einer erneuten Inkubation von 10 min auf Eis wurden die Bakterien wiederum abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 20 ml TB-Puffer aufgenommen. Tropfenweise wurde DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % zugegeben. Anschließend wurden die Bakterien aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schnell eingefroren und bei -80°C gelagert.

5.1.3.16 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von Plasmid-DNA nach Hanahan (1985) in kompetente *E. coli*-Zellen wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 50 ng Plasmid-DNA bzw. 5-10 µl eines Ligationsansatzes dazugegeben und gut vermischt. Der Transformationsansatz wurde für 30 min auf Eis, 1 min bei 42°C und dann für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 µl SOC-Medium dazu gegeben. Bakterien, die mit einem Ampicillin-Resistenz vermittelnden Plasmid transformiert worden waren, wurden sofort auf Agarplatten ausgestrichen. Die anderen Transformationsansätze wurden für 30 min bei 37°C und 230 rpm im Inkubationsschüttler kultiviert und anschließend ausgestrichen. Je nach eingesetzter DNA-Menge wurden 50-250 µl von dem Transformationsansatz auf Agarplatten (mit dem entsprechenden Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.1.3.17 Selektion transformierter *E. coli*-Bakterien

5.1.3.17.1 Blau-Weiß-Screening

Beim Blau-Weiß-Screening produzieren die eingesetzten Bakterien eine inaktive β -Galaktosidase, die durch β -Komplementation aktiviert wird. Das für die Komplementation notwendige Protein wird auf dem Plasmid kodiert und enthält einen multiplen Klonierungsbereich. Durch den Einbau eines Inserts in diesen Klonierungsbereich wird die kodierende Sequenz unterbrochen und die Bildung des für die Komplementation notwendigen Proteins unterbleibt. Damit kann keine β -Galaktosidase in den Bakterien synthetisiert werden. Da die β -Galaktosidase das Substrat X-Gal zu einem blauen Farbstoff hydrolysiert, lassen weiße Kolonien auf ein Plasmid mit Insert schließen, wohingegen negative Klone blau gefärbt sind. Zur Isolation von positiven Transformanten wurden die Bakterien nach der Transformation auf LB-Platten mit Antibiotikum, die mit 15 ml 20 % (v/v) IPTG und 50 μ l 2 % (w/v) X-Gal in DMF bestrichen waren, aufgebracht.

5.1.3.17.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde als zweite Methode zur Isolation von positiven Transformanten eingesetzt: Eine Einzelkolonie wurde mit Hilfe eines Zahnstochers in ein PCR-Reaktionsgefäß, in dem bereits die Komponenten für eine PCR vorgelegt worden waren, überführt. Durch Rühren wurden Bakterien von dem Zahnstocher gelöst, der dann nachfolgend zum Animpfen einer Flüssigkultur diente. Durch Kochen der Bakterien im Verlauf der PCR wurde die Plasmid-DNA freigesetzt und konnte als Matrize zur Amplifikation spezifischer Fragmente dienen (5.1.3.19).

5.1.3.17.3 Restriktionsanalyse

Für die Überprüfung der Klonierung mittels Restriktion wurden 12 Kolonien pro Platte einer Transformation ohne vorheriges Blau-Weiß-Screening bzw. 6 weiße Kolonien aus einem Blau-Weiß-Screening zum Animpfen von 3 ml-Minikulturen eingesetzt. Nach der Inkubation der Bakterien-Kulturen bei 37°C über Nacht im Schüttelinkubator wurde die Plasmid-DNA isoliert und geschnitten. Die Restriktionsansätze wurden elektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt, sodass anhand des Bandenmusters erfolgreich transformierte Klone identifiziert werden konnten.

5.1.3.18 Sequenzanalyse

Für die Sequenzierung wurde hochreine DNA eingesetzt. Die Sequenzierung wurde von der Firma Agowa (Berlin) nach dem Kettenabbruch-Verfahren von Sanger et al. (1977) durchgeführt. Das automatisierte Sequenzierverfahren beruht auf dem Einbau nukleotidspezifischer Farbstoffe während der Sequenzreaktion, die nach Anregung durch Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge Licht in einer anderen spezifischen Wellenlänge wieder emittieren. Dadurch können die DNA-Fragmente bereits während der Auftrennung der Sequenzreaktionsprodukte nachgewiesen werden. Ein Computer wertet die aufgenommenen Lichtsignale automatisch aus.

5.1.3.19 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (Mullis und Faloona, 1987) wurde in dieser Arbeit zur Gewinnung der schistosomalen Promotorenfragmente aus genomischer DNA, zur Amplifikation von cDNA-Sequenzen aus einem Transkriptionsansatz (5.1.3.4), bei der Überprüfung des Transformationserfolges in der Kolonie-PCR (5.1.3.17.2) und zur Isolation von unbekannten Sequenzen in der inversen PCR (5.1.3.19.3) eingesetzt. Sie wurde mit den unter 5.2.6 angegebenen PCR-Primern in einem Thermocycler (Perkin/Elmer, USA) durchgeführt. Zur Durchführung der PCR mit der Taq-Polymerase (Saiki et al., 1988) wurden folgende Substanzen in einem 0,2 oder 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß vereinigt:

5 µl 10x PCR-Puffer
 1 µl 10 mM dNTP-Mix
 1,5 µl 50mM MgCl₂
 2 µl 10 µM Primer 1
 2 µl 10 µM Primer 2
 1-10 µl Vorlagen-DNA
 2,5 Einheiten Taq-Polymerase
 steriles Wasser ad 50 µl

Im ersten Programmschritt wurde die DNA für 3 min bei 94°C denaturiert. Es erfolgte die Amplifikation in 30-35 Zyklen: 1 min Denaturieren des DNA-Doppelstranges bei 94°C; 1 min Hybridisierung der Primer mit der DNA (5.1.3.19.1), 1 min Polymerase-Reaktion pro 1000 bp bei 72°C. Nach dem letzten Zyklus wurden die Proben 10 min bei 72°C inkubiert, um die Synthese aller DNA-Moleküle durch die Polymerase zu

vollenden, zur Klonierung in pGEM-T easy (5.1.3.19.2) wurde dieser Schritt auf 20 min verlängert.

5.1.3.19.1 Primerdesign

Zur spezifischen Amplifikation wurden Primer mit einer Länge von 18-25 Nukleotiden eingesetzt, wobei der Anteil an G/C-Nukleotiden ca. 50 % betrug. Um eine bessere Bindung der Primer an die DNA zu ermöglichen und um damit eine fehlerhafte Amplifikation zu verhindern endeten die Primer vorzugsweise mit 1-2 G/C-Nukleotiden am 3'-Ende. Für die Klonierung konnte am 5'-Ende eine Restriktionsschnittstelle eingeführt werden, ein weiteres überhängendes Ende aus unspezifischen Nukleotiden am 5'-Ende sorgte für ein effizientes Schneiden des PCR-Produktes mit dem Restriktionsenzym. Die Schmelztemperatur T_M für die PCR wurde mit der Formel:

$$T_M = \{22 + 1,46 * [(Anzahl A + Anzahl T) + 2 * (Anzahl G + Anzahl C)]\}^{\circ}C$$

kalkuliert.

5.1.3.19.2 Klonierung von PCR-Produkten

Die in der PCR eingesetzte Taq-Polymerase hängt an den 3'-Enden der DNA-Fragmente unspezifisch einen Adenosinrest an, der zur Klonierung in den Vektor pGEM-T-Easy (Stratagene, Heidelberg) mit 3'-T-Überhang genutzt wurde. Für die Ligation wurde folgender Ansatz pipettiert und nachfolgend über Nacht bei 4°C inkubiert:

5 µl 2x Rapid Ligations Puffer

0,5 µl pGEM-T easy

PCR-Produkt im Verhältnis 1:3

1 µl T4 DNA-Ligase

Wasser ad 10 µl

5.1.3.19.3 Inverse PCR

Die inverse PCR (Ochman et al., 1993) ermöglicht es, unbekannte genomische Sequenzen in der Nachbarschaft bekannter Sequenzbereiche zu analysieren. Sie wurde eingesetzt zur Klonierung des 5'-Bereiches des Cathepsin D und des Aktins von *S. mansoni*.

Nach dem Schneiden von schistosomaler genomischer DNA mit einer Restriktionsendonuklease (5.1.3.7) wurde das Restriktionsenzym durch Hitzeeinwirkung inaktiviert. Die DNA-Fragmente wurden stark verdünnt und durch

Ligation (5.1.3.14) zu DNA-Ringen zirkularisiert. Diese DNA-Ringe dienten als Matrize in einer PCR, in der Primer eingesetzt wurden, die eine entgegengesetzte Orientierung aufwiesen. Die PCR-Amplifikate wurden über ein Agarosegel aufgetrennt (5.1.3.8) und in pGEM-T easy (5.1.3.20.2) zur Sequenzierung kloniert.

5.1.4 Zellbiologische Methoden

5.1.4.1 Zellkultur

5.1.4.1.1 Kultur von *HeLa*- und *cos7*-Zellen

HeLa-Zellen wurden in RPMI komplett mit nicht inaktiviertem fetalem Rinderserum (FCS) bei 37°C und 5 % CO₂ (Standardbedingungen für die Zellkultur) kultiviert. Zellen in konfluent bewachsenen Zellkulturflaschen wurden zur Passagierung zunächst zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Trypsin/EDTA-Verdau bei 37°C für 2 min vom Boden gelöst. Das Trypsin wurde inaktiviert durch Zugabe von RPMI komplett. Die Zellen wurden bei 800 rpm zentrifugiert und 1:4 in frischem RPMI komplett verdünnt in neue Zellkulturflaschen überführt. *Cos7*-Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen in RPMI komplett mit hitzeinaktiviertem FCS kultiviert. Zur Passagierung wurden diese Zellen mit dem Zellschaber gelöst und in neue Zellkulturflaschen überführt.

5.1.4.1.2 Einfrieren von Zellen

Zellen wurden in FCS, dem 10 % DMSO zugefügt worden war, durch langsames Abkühlen in einer Styroporbox bei –80°C eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

5.1.4.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauerzählkammer bestimmt, tote Zellen wurden zur Unterscheidung von lebenden Zellen mit Trypan-Blau (Sigma, München) angefärbt und bei der Bestimmung der Zellzahl nicht berücksichtigt.

5.1.4.1.4 Methoden zur genetischen Transformation von Zellen

5.1.4.1.4.1A) DEAE-Dextran

Durch Inkubation von DNA mit DEAE-Dextran werden bei dieser Methode DNA-haltige Komplexe erzeugt, die sich an die Zelloberfläche heften und die Aufnahme der DNA in die Zelle durch Endocytose ermöglichen. 10⁵ Zellen wurden am Vortag der Transfektion pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät. Nachdem die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen worden waren,

wurden sie in 4 ml Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) komplett kultiviert. Pro Transfektionsansatz wurden 4 μ g DNA in sterilem 1 x TBS gelöst. Zu der gelösten DNA wurden 80 μ l DEAE-Dextran (10mg/ml) zugegeben. Diese Lösung wurde den Zellen zugesetzt. Nach einer Inkubation von 4 h bei 37°C wurde das Transfektionsmedium entfernt. Die Aufnahme von DNA in die Zellen wurde erhöht, indem sie für 1 min in 1 x PBS inkl. 10 % DMSO bei RT inkubiert wurden. Danach wurden sie einmal mit 1 x PBS gewaschen und unter Standardbedingungen weiterkultiviert.

5.1.4.1.4.2B) Lipofektion

Die Transfektion von *HeLa* Zellen erfolgte mit einem für die Transfektion von Endothelzellen optimiertem Materialsatz Lipofectin Reagent (Invitrogen, Karlsruhe). Lipofectin ist ein synthetisches Lipidpolymer, das unter physiologischen Bedingungen mit der Zellmembran verschmilzt und so eine effiziente DNA-Aufnahme durch Endozytose in die Zelle ermöglicht. Am Vortag der Transfektion wurden 10^5 Zellen pro Vertiefung einer 12-Loch-Platte ausgesät. 2 μ g DNA und 8 μ l Lipofectin wurden separat in 100 μ l serumfreien DMEM für 30 min bei RT inkubiert. Nach dem Mischen beider Lösungen wurde die fertige Transfektionslösung 30 min bei RT inkubiert. Die Transfektionslösung wurde mit 800 μ l DMEM ergänzt und zu den Zellen gegeben, die zuvor mit 1 x PBS gewaschen worden waren. Die Inkubation in dem Transfektionsmedium erfolgte für mindestens 6 h unter Standardbedingungen. Anschließend wurde das Transfektionsmedium durch RPMI komplett ersetzt.

5.1.4.1.4.3C) Elektroporation

10^6 *cos7*-Zellen wurden für die Elektroporation (5.1.2.2) in RPMI komplett mit 5 mg DNA bei RT in 4mm Elektroporationsküvetten (peqLAB, Erlangen) für 10 min inkubiert. Elektroporiert wurde bei einer Feldstärke von 3,75 kV/cm mit 1-2 Pulsen von 90 μ s Länge. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in den Küvetten für 30 min bei 37°C gehalten, bevor sie wieder in Zellkulturflaschen überführt und unter Standardbedingungen für die Zellkultur weiterkultiviert wurden.

Zur Induktion des HSP70-Promotors wurden Zellen 24 h nach der Transfektion für 4 h bei 42°C inkubiert und dann bei 37°C unter Standardbedingungen für die Zellkultur weiterkultiviert.

5.1.4.2 Mikroskopie

Lichtmikroskopische und epifluoreszenzmikroskopische Arbeiten wurden an einem Zeiss Axioplan Fluoreszenzmikroskop mit Blaulichtfilter Nr. 487909 und Grünlichtfilter Nr. 487915 durchgeführt. Mit Hilfe eines Kameraaufsatzes und einer elektronischen Steuereinheit für die Kamera wurden mikroskopische Bilder nach der Bedienungsanleitung des Herstellers aufgenommen. Zur Verbesserung der Detektion von EGFP-Fluoreszenz wurde das Leica DM/R Mikroskop mit digitaler Bildspeicherung eingesetzt. Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie wurde durchgeführt an einem Leica TCS SP Mikroskop mit einem Argon/Krypton-Gaslaser (Leica). Der Laser wurde auf 50-60 % eingestellt, die Anregungswellenlänge für GFP war 488 nm. Störende endogene Fluoreszenz unter der Blaulichtanregung wurde durch Quenchen mit Trypan-Blau nach der Methode von Loike und Silverstein (1983) verhindert.

5.1.4.3 Methoden zur histologischen Untersuchung

5.1.4.3.1 Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität in fixierten Zellen und Geweben

Zur histologischen Untersuchung mussten Zellen nach ihrer Transfektion in einem geeigneten Kulturgefäß (35 mm Petrischale oder 6 Loch-Platte) kultiviert werden. 48 h nach der Transfektion mit β -Galaktosidase exprimierenden Plasmiden wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen, die Fixierung der Zellen erfolgte für 10 min in 1 x PBS inkl. 1 % Glutaraldehyd unter leichtem Schwenken. Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal mit 1 x PBS inkl. 1mM $MgCl_2$ vorsichtig gewaschen, ohne sie vom Boden des Kulturgefäßes zu lösen. Danach wurden die fixierten Zellen in der Färbelösung bei 37°C inkubiert bis die gewünschte Färbung erreicht wurde. Ganze Schnecken wurden nach dem Entfernen der Gehäuse für 45 min in Fixierlösung auf Eis unter leichtem Schwenken fixiert. Dann wurden die fixierten Proben dreimal für 15 min mit Waschpuffer gewaschen und mit der Färbelösung über Nacht bei 37°C unter Schütteln im Dunkeln inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten für 10 min mit 1 x PBS wurden die Proben in Bouin-Lösung nachfixiert und bei 4°C gelagert (5.2.16).

5.1.4.3.2 Gefrierschnitte

Die Gehäuse der Schnecken wurden unter dem Binokular entfernt. Nach einem kurzen Waschen in 1 x PBS wurden die Schnecken in die Mitte von

Einbettungsschalen platziert und mit dem Einbettungsmedium Tissue Tec bedeckt. Ein rasches Einfrieren wurde erreicht, indem die Einbettungsschalen während des ganzen Vorgangs auf Trockeneis inkubiert wurden. Eingefrorene Proben wurden bis zu ihrer Aufbereitung bei -80°C gelagert. Das Schneiden von $10\text{ }\mu\text{m}$ Schnitten wurde im Cryocut (Reichert-Jung (Leica), Solms) durchgeführt. Die Schnitte wurden auf beschichtete Objektträger (Superfrost/Plus, Roth, Karlsruhe) überführt und nachfolgend für 10 min in 1 x PBS inkl. 2,5 % Paraformaldehyds fixiert.

5.1.4.3.3 Paraffinschnitte

Gehäuse zu untersuchender Schnecken wurden mit Hilfe einer Pinzette unter dem Binokular entfernt, die anschließende Fixierung erfolgte in Bouin-Lösung bei RT. Die anschließende histologische Aufarbeitung der Proben wurde von Frau Marko und Dr. Bleiß (AG Elektronenmikroskopie; Lehrstuhl für Molekulare Parasitologie; Humboldt-Universität) durchgeführt: Die Proben wurden mit 70 % Ethanol gewaschen, in 100 % Ethanol entwässert und in Xylol überführt. Dann erfolgte die Einbettung in Paraplast Plus (Paraffin) unter Einsatz von Standardmethoden (Romeis. 1989; Lemos and Andrade, 2001). Fünf-Mikrometer-Semidünnschnitte wurden mit Haematoxylin und Eosin gefärbt und mikroskopisch untersucht.

5.1.5 Biochemische Methoden

5.1.5.1 Proteingestamtextraktion aus *B. glabrata* und *S. mansoni*

20-40 adulte Würmer oder der Hepatopankreas einer Schnecke wurden zunächst mit kleinen Pistillen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gemörsert. Für den anschließenden Zellaufschluss wurde ein Ultraschallgerät (Heinemann, Schwäbisch Gmünd) eingesetzt. Die Proben wurden nach Zugabe von 500 μl 1 x PBS auf Eis für 3 min bei 180 Pulsen pro Minute homogenisiert. Anschließend wurde der Extrakt für 5 min bei 10000 g zentrifugiert und bei -20°C gelagert.

5.1.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen wurde die Methode von Bradford (1976) eingesetzt. Dazu wurde der Materialsatz Bio-Rad Protein Assay (Biorad, München) nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.1.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der SDS-Gelelektrophorese werden Proteine in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) auf Grund ihres Molekulargewichtes im Polyacrylamidgel

aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Proteine werden denaturiert und durch Anlagerung von SDS negativ geladen.

Für die Auftrennung von Proteinen wurden 6 %ige Sammelgele und 10 %ige Trenngele verwendet. Eine Proteinprobe wurde im Verhältnis 1:1 mit 2 x Probenpuffer versetzt, nachfolgend für 5 min bei 95°C erhitzt und für 5 min bei 12000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf das Gel aufgetragen und bei 120 V für 1,5 h aufgetrennt. Zur Visualisierung der Proteine im Gel, wurde es mit Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend mehrfach in Entfärbelösung entfärbt.

5.1.5.4 Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität im Proteingestamtextrakt

Zum Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität wurde das High sensitivity β -Galactosidase Assay Kit (Stratagene, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Grundlage ist die Spaltung von Chlorophenol-Rot- β -D-Galaktopyranosid (CPRG) in Galaktose und das Chromophor Chlorophenol -Rot, durch die β -Galaktosidase. Der damit verbundene Farbumschlag von gelb nach rot lässt sich photometrisch durch Messung der Extinktion bei 570 nm quantifizieren.

Cos7-Zellen wurden in dem Lysis-Puffer aufgeschlossen, für die Messung von β -Galaktosidase-Aktivität von Schnecken oder Würmern wurde der Proteingestamtextrakt eingesetzt (5.1.5.1).

5.1.6 Immunologische Methoden

5.1.6.1 Western-Blot

Der immunologische Nachweis von Proteinen wurde nach der Methode von Towbin et al. (1979) durchgeführt. Im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennte Proteine (6.1.5.3) wurden über Nacht in Transferpuffer bei 80 mA auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde die Membran 1 h in Blocklösung inkubiert und anschließend dreimal für 5 min in 1 x PBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem ersten an *E. coli*-Lysat präadsorbierten Antikörper (Kaninchen-Antiserum gegen EGFP bzw. Maus-Antiserum gegen EGFP) in einer Verdünnung von 1:200 in 1 x PBS-T. Nach 1 h wurde die Membran wiederum für dreimal 5 Minuten 1 x PBS-T gewaschen und mit dem zweiten Antikörper (Peroxidase-konjugierter Anti-Kaninchen bzw. Anti-Maus-Antikörper) in einer

Verdünnung von 1:2500 für eine Stunde inkubiert. Wiederum wurde dreimal für 5 min mit 1 x PBS-T gewaschen. Die Entwicklung des Blots fand in Peroxidase-Substratlösung statt. Waren die Banden gut sichtbar, wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von Wasser abgestoppt.

5.1.6.2 Immunhistochemie

Fixierte Gefrierschnitte (5.1.4.3.2) wurden zum Waschen 1 min in 1 x PBS inkubiert. Nachfolgend wurde die endogene Peroxidase-Aktivität durch Inkubation in Methanol inkl. 0,3 % H_2O_2 geblockt. Die Schnitte wurden dreimal für 5 min in 1 x PBS-T gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper (Kaninchen-Antiserum gegen EGFP bzw. Maus-Antiserum gegen EGFP) in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:400 inkubiert. Nach dem Waschen für 10 min in 1 x PBS-T wurden die Schnitte für 30 min bei RT mit dem zweiten Antikörper (Peroxidase-konjugierter Anti-Kaninchen bzw. Anti-Maus-Antikörper) in einer Verdünnung von 1:800 inkubiert. Mit 1 x PBS-T wurde für 10 min gewaschen und die Schnitte mit der DAB-Färbelösung inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Inkubation der Schnitte in 1 x PBS.

5.1.7 Datenverarbeitung

Die Auswertung von Sequenzdaten und die Suche nach Sequenzen erfolgte mit Programmpaketen, die im Internet zur Verfügung standen (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> und TIGR *Schistosoma mansoni* Gene Index (SMGI) <http://www.tigr.org/tdb/tgi/smgi/>); Promotoranalysen wurden mit dem MatInspector (Quandt et al., 1995) unter <http://www.genomatix.de> durchgeführt. Die statistische Auswertung durch den Student'schen T-Test wurde unter http://www.bio.miami.edu/rob/perls_t/ durchgeführt.

Fotos von Mikroskopischen Präparaten wurden gescannt, die Kontrastverstärkung und Tonwertkorrektur wurde mit Adobe Photoshop 5.0 durchgeführt; zusammengestellt und beschriftet wurden die Bilder in Microsoft PowerpointX:Mac.

5.2 Materialien

5.2.1 Laborgeräte

Binokular	Leica, Solms
Cryocut E Reichert-Jung	Leica, Solms
Elektroporator BTX ECM830	Qbiogene, Heidelberg
Mikroinjektionsnadelhersteller	Kopf Instruments, USA
Mikroinjektor 5242	Eppendorf, Hamburg
Mikromanipulator	Leitz, Wetzlar
Mikroprojektil-Schießanlage, PDS-1000/He	Biorad, München
Mikroskope	
Leica TCS NT	Leica, Solms
Zeiss Axioplan	Zeiss, Oberkochen
Leica DM/R	Leica, Solms
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler GeneAmp PCRSys ^{tem} 9600	Perkin/Elmer, USA
Ultraschallgerät HD 200	Heinemann, Schwäb.Gmünd
Videodokumentationsanlage	Herolab, Wiesloch
Zentrifugen 5810R, 5415C und 5417R	Eppendorf, Hamburg

5.2.2 Verbrauchsmaterialien

Die allgemeinen Verbrauchsmaterialien für das Labor (Petrischalen; Pipettenspitzen; 0,2, 0,5, 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße; Gefrier Röhrchen; 12, 14 und 50 ml Polypropylen-Röhrchen) wurden von Greiner (Nürtingen) bezogen. Verbrauchsmaterialien für den Mikroprojektilbeschuss (Macro-u. Microcarrier; Rupture Discs; Stopping Screens) stammten von Biorad (München) und die Verbrauchsartikel für die Zellkultur (6 u. 12 -Lochplatten, Petrischalen, Zellkulturflaschen) wurden von Costar (Bodenheim) hergestellt.

Einbettungsmedium Tissue Tek	Sakura Finetek, Niederlande
Einbettungsschalen	Roth, Karlsruhe
Elektroporationsküvetten (4mm)	peqLab, Erlangen
Filme	
Fujicolor HG 1600 und Superia 400	Fuji, Japan
Professional T400 CN	Kodak, USA
Einwegkanülen- u. spritzen	Braun, Melsungen
Einwegpasteurpipetten	Greiner, Nürtingen
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Glaskapillaren zur Mikroinjektion	Kopf Instruments, USA
Mikroinjektionsnadeln	Clark Elektromedical Instruments, GB

Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel
Petrischalen mit Polycarbonat-Membraneinsatz	Costar, Bodenheim
Objektträger und Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Sterilfilter	Schleicher & Schuell, Dassel

5.2.3 Reagenzien

Die allgemeinen Chemikalien stammten von den Firmen Roth (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt) und Sigma (München) und besaßen „zur Analyse“-Qualität; für die Zellkultur oder die Kultur von Parasiten wurden Chemikalien eingesetzt, die lt. Hersteller für die Molekularbiologie getestet waren. Organische Lösungsmittel wurden außerdem von Merck, Darmstadt und von der Humboldt-Universität bezogen.

Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	AppliChem, Darmstadt
Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Antibiotika	AppliChem, Darmstadt; Serva, Heidelberg
ATP-Dinatriumsalz	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, München
Chlornaphtol	Serva, Heidelberg
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	AppliChem, Darmstadt
3,3'-Diaminobenzidin-HCl (DAB)	AppliChem, Darmstadt
Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran)	Sigma, München,
DNA-Größenmarker	
1-kb-DNA-Leiter	Rapidozym, Berlin
SmartLadder DNA-Marker	Eurogentec, Belgien
Dithiothreitol (DTT)	Promega, Mannheim
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's MEM	Biochrom KG, Berlin
dNTP-Mix	Rapidozym, Berlin
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Sigma, München
Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma, München
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin
Ficoll 400 und 1600	Serva, Heidelberg
Fluoreszein-Isothiocynat (FITC) Oligonukleotide	MWG Biotech, Ebersberg
Glutaraldehyd	Sigma, München

Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
L-Serin	Sigma, München
MEM-Aminosäurelösung	Sigma, München
MEM-Vitamin-Lösung	Sigma, München
Metofane	nicht mehr hergestellt
Milchpulver	AppliChem, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma, München
Nonidet P-40	Sigma, München
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Biochrom KG, Berlin
Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	AppliChem, Darmstadt
Propidiumiodid	Sigma, München
Proteingrößenmarker	New England Biolabs, Schwalbach
RPMI 1640	Biochrom KG, Berlin
Spermidin	Sigma, München
Trypan-Blau	Sigma, München
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco/LifeTechnologies, Karlsruhe
Trypton	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4Chlor-3-indonyl-b-D-galactopyranosid (X-Gal)	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Fluka, Neu-Ulm

5.2.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Schwalbach
DNase (RNase frei)	Stratagene, Heidelberg
Klenow-Fragment	New England Biolabs, Schwalbach
Lysozym	AppliChem, Darmstadt
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
M-MLV Reverse Transkriptase (H-)	Promega, Mannheim
RNase A	Qiagen, Hilden
RNase Block	Stratagene, Heidelberg
Taq-Polymerase	Rapidozym, Berlin
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Schwalbach

5.2.5 Kommerzielle Kits

DNeasy Tissue Kit	Qiagen, Hilden
High sensitivity Beta-GAL Assay Kit	Stratagene, Heidelberg
Lipofectin Reagent	Invitrogen, Karlsruhe

Nucleobond Plasmid Midi Kit
 Nucleospin Plasmid Mini Kit
 Nucleospin Extraction Kit
 pGEM-T Easy Vector System I
 Proteinnachweis nach Bradford
 QIAshredder
 RNeasy Mini Kit

Clontech, Heidelberg
 Clontech, Heidelberg
 Clontech, Heidelberg
 Promega, Mannheim
 Biorad, München
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden

5.2.6 Primer

P-505-F	ATGACGGAACACTCACCTAAGG
P-532-F	AAGTTAAAATCTATTCCCCC
P-557-F	CGATTCAAGTTAACGCCATTTTGG
P-622-F	ATGCACGGAATCACGGAC
P-1982-F	CCCTAAAAAGGACAGCAACGATTG
P-2010-F	CCAAGTATGTTTATCGGCGTC
P-2193-R	GAGTGATGATGGCGGTTTTAGG
P-2429-R	GGTTCCGATTTGGCATTCTG
P-3430-F	GCTGTCAGAAATCTAAGG
P-3447-R	CCTTAGATTTCTGACAGC
P-4464-R	CTACGTGCAATAGTCGTTAAGATGTTCTGG
P-4882-R	ACATACAAGTATGGTCCG
Aktin invers1	GATCTTGACTGAGAGAGG
Aspinvers1	GAAGAACTAGAAGCAGC
Aspinvers2	GTTGCATCTGAAGTGG
Aktin-for	CCCCCAAGCTTAGACACCTAATC
Aktin-rev	CCCCCGAATTCTTTACTAGATGATGAGAC
Asp-for	CCCCCAAGCTTACTGGGAGCATAA
Asp-rev	CCCCCGAATTCCTTATCATTCAA
Cal-for	GCGCGGAATTCCTAACCGAATCTATTCTG
Cal-rev	GCGCGAAGCTTCCTGACAGACAAAACCGTG
Gst-for	GCGCGGAATTCGTGAATGCGACTGCTGAGG
Gst-rev	GCGCGAAGCTTCTTGCAAATAGACAAAAC
Hsp-for	GCGCGGAATTCGATTAGCACTAAG
Hsp-rev	GCGCGAAGCTTTCCAAGATATGTTAAGAC
Hsp-revBamHI	GCGCGGGATTCTCCAAGATATGTTAAGAC
LTR-for	CCCCCAAGCTTCCGTACACTAAATGGGGACG
LTR-rev	CCCCCGAATTCTGTACCAGATCACGTCAGGC
DsRed-for	ATTTATCCCGGGATGGCCTCCTCCGAGGAC
DsRed-rev	ATTTATGCGGCCGCCTACAGGAACAGGTGG

Hsp3'-for	CCCCCTCTAGACCTATAATTGTTGTGATAAATTG
Hsp3'-rev	CCCCCAAGCTTAGAACCCTTCCACGGTGTG
EGFP-for	CCCCCGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAG
EGFP-rev	CCCCCAAGCTTACTTGTACAGCTCGTC
EGFP-nestedfor	GCAGTGCTTCAGCCGCTA
EGFP-nestedrev	TAGTGGTTGTCTGGGCAGC
Cytox-for	GATTTGCGCTATGGCTTC
Cytox-rev	GGCCATCACCATACTAGC
oligo-dT	15-18 T

5.2.7 Agarosegelelektrophoresepuffer

10 x TAE	0,4 M Tris-Acetat 0,01 M EDTA (pH 8) 1,14 % Eisessig
Ethidiumbromidlösung	10 mg / ml in H ₂ O

6 x Probenpuffer	0,2 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 15 % Ficoll
------------------	---

5.2.8 Puffer für Plasmidpräparationen nach Willimzig (1985)

TELT-Lösung	50 mM Tris/HCl pH 8 62,5 mM EDTA 2,5 M LiCl 0,4 % Triton X-10
-------------	--

5.2.9 Bakterien und Zelllinien

XL-1 Blue	Stratagene, Heidelberg
GM2163 (Dam-/Dcm-)	New England Biolabs, Schwalbach
HeLa-Zellen	Adenocarcinoma-Zellen, Homo sapiens
COS7-Zellen	Nierenzellen, Cercopithecus aethiops

5.2.10 Plasmide

pEGFP-N1	(EGFP-Sequenz, kanR)	BD Biosciences Clontech, USA
pBluescript SK+	(Klonierungsplamid, ampR)	Stratagene, Heidelberg

pUC19	(Klonierungsplamid, ampR)	Yanisch-Perron et al., 1985
pSLfa1180fa	(Klonierungsplasmid, ampR)	E. Wimmer, Bayreuth
pDsRed	(DSRed-Sequenz, ampR)	D. Buhmann, Berlin (2003)
pb-Gal	(b-Galaktosidase-Sequenz, ampR)	A. Mißlitz, Berlin (2000)
pPD118.20	(C.elegans-Konstrukt, ampR)	Fire Lab (1997)

5.2.11 Bakterienkultur-Medien

LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1l H ₂ O pH 7,0
LB-Agar	LB-Medium 1,5 % Agar-Agar
SOC-Medium	20 g Trypton 24 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 25 mM KCl 250 mM MgCl ₂ 20 mM sterilfiltrierte Glucose pH 7,0 H ₂ O ad 1 l
TB-Puffer	10 mM PIPES 55 mM MnCl ₂ 15 mM CaCl ₂ 250 mM KCl
X-Gal-Stammlösung	20 mg/ml in DMSO
IPTG-Stammlösung	1 M in H ₂ O
1000 x Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O
1000 x Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O

5.2.12 SDS-Polyacrylamid-Gele

Laufpuffer	14,41 g Glycin 3,03 g Tris 1 g SDS H ₂ O ad 1l
2 x Probenpuffer	125 mM Tris/HCl (pH 6,8) 4 % SDS 20 % Glycerin 0,2 % Bromphenolblau
Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung	29,2 % Acrylamid 0,8 % Bisacrylamid
APS	10 % in H ₂ O
Lösung L	1,5 M Tris/HCl (pH 8,4) 0,4 % SDS
Lösung M	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,4 % SDS
Sammelgel 6 %	375 µl Acrylamid-Stock 625 µl Lösung M 2,5 µl TEMED 1,5 ml H ₂ O 25 µl APS
Trenngel 10 %	1,7 ml Acrylamid-Stock 1,25 ml Lösung L 5 µl TEMED 2 ml H ₂ O 50 µl APS
Färbelösung	10 % Essigsäure 20 % Ethanol 0,2 % Coomassie Blau R-250

Entfärbelösung	10 % Essigsäure
	20 % Ethanol

5.2.13 Immunoblot

Transferpuffer	25 mM Tris-HCl
	192 mM Glycin
	10 % Methanol

1 x PBS	137 mM NaCl
	2,7 mM M KCl
	8,1 mM Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	pH 7,4

Waschpuffer (1 x PBS-T)	Tween 500 µl
	1 x PBS ad 1l

Blockpuffer	5 % Magermilch in Waschpuffer
-------------	-------------------------------

Peroxidase-Substratlösung	10 ml 1 x TBS
	600 µl 0,3 % Chloramphenicol
	5 µl 30 % H ₂ O ₂

primäre Antikörper	Kaninchen-Antiserum gegen EGFP
	Maus-Antiserum gegen EGFP
	Maus-Infektionsserum gegen Schistosoma mansonii

sekundäre Antikörper	IgG Ziege-Anti-Kaninchen, Peroxidase-gekoppelt
	IgG Ziege-Anti-Maus, Peroxidase-gekoppelt
	Dianova, Hamburg

5.2.14 Medien für die Zellkultur

RPMI komplett	RPMI 1640
	0,002 M L-Glutamin
	100 U/ ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	5-10 % FCS

1 x TBS

1 M NaCl
0,05 M Tris
pH 7,4

Dulbecco's MEM (DMEM) komplett

Dulbeccos MEM
0,002 M L-Glutamin
100 U/ ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
5 % hitzeinaktivierten FCS

5.2.15 Mikroinjektionspuffer

1 x Mikroinjektionspuffer für Sporozysten

10 mM Tris pH 7,4
0,25 mM EDTA

5.2.16 Puffer für die β -Galaktosidase-Färbung

1 x Natriumphosphatpuffer 0,1 M pH 7,3

11,5 ml 1 M NaH_2PO_4
38,5 ml 1 M Na_2HPO_4
 H_2O ad 500 ml

für Zellkultur-Zellen

Fixierlösung

1 % Glutaraldehyd in 1 x PBS

Waschpuffer

1 mM MgCl_2 in 1 x PBS

Färbelösung

250 µl 20 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ in 1 x PBS
250 µl 20 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ in 1 x PBS
1 µl 1 M MgCl_2
50 µl 2 % X-Gal
1 x PBS ad 1 ml

für Schnecken

Fixierlösung

0,4 ml 25 % Glutaraldehyd

	1 ml 250 mM EGTA pH 7,3 5 ml 1 M MgCl ₂ 43, 5 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,3 0,02 % Nonidet P-40
Waschpuffer	1ml 1 M MgCl ₂ 5 ml 1 % Natriumdeoxycholat in H ₂ O 5 ml 2 % Nonidet P-40 in H ₂ O 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,3 ad 500 ml
Färbelösung	180 µl 1 M X-Gal in DMSO 0,159 g K ₄ Fe(CN) ₆ ·3H ₂ O 0,123 g K ₃ Fe(CN) ₆ Waschpuffer ad 75 ml

5.2.17 Puffer für die Immunohistochemie

Fixierlösung	2,5 % Glutaraldehyd in 1 x PBS
Blockpuffer (endogene Peroxidase)	0,4 % H ₂ O ₂ in Methanol
Blockpuffer (Fc Rezeptoren)	2 % unspezifisches Serum in 1 x PBS-T
Peroxidase-Substratlösung (DAB-Lösung)	0,1 % NiCl 4 µl DAB (25 mg/ml) 32 µl 0,4 % H ₂ O ₂ 160 µl 1 x PBS

5.2.18 Tiere und Medien zu ihrer Haltung

BALB/c-Mäuse, Inzucht-Stamm (<i>Mus musculus</i>)	institutseigene Zucht
Wüstenrennmaus, Inzucht-Stamm (<i>Meriones unguiculatus</i>)	institutseigene Zucht
Wasserlungenschnecken (<i>Biomphalaria glabrata</i>) (Stamm Puerto Rico)	Dr. M. J. Doenhoff (School of Biological Sciences, University of Wales)
Pärchenegel (<i>Schistosoma mansoni</i>) (Stamm Puerto Rico)	Dr. M. J. Doenhoff (School of Biological Sciences, University of Wales)

Caenorhabditis elegans

institutseigene Zucht

100 x H₂O zur Schneckenhaltung

16,5 g CaCl₂
 0,3 g K₂CO₃
 1 g NaOH
 10,5 g MgCl₂*6H₂O
 2 g NaHCO₃
 1 g CaCO₃
 H₂O ad 1 l

MEMSE-J (Sporozystenkulturmedium)
 (Kawanaka et al., 1986)

20 ml MEM-Aminosäure-Lösg. 50 x
 300 mg L-Glutamin 300 mg
 10 mg Glycin
 30 mg L-Serin
 10 ml MEM-Vitamin-Lösg. 100 x
 6,8 g NaCl
 400 mg KCl
 200 mg CaCl₂
 200 mg MgCl₂*6H₂O
 150 mg NaH₂PO₄*2H₂O
 2 g NaHCO₃
 2 g Glucose
 10 ml Pen-Strep-Lösung
 H₂O ad 900 ml; pH 7,2
 100 ml FCS; sterilfiltrieren

6 Literaturverzeichnis

- Abbas MK & Cain GD:** Analysis of isoforms of actin in *Schistosoma mansoni* by two-dimensional gel electrophoresis. *Parasitol Res.* 1989; **76**: 178-80.
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Siden-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirkas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC:** The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science.* 2000; **287**: 2185-95.
- Adamson R, Lyons K, Sharrard M, Kinnaird J, Swan D, Graham S, Shiels B, Hall R:** Transient transfection of *Theileria annulata*. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; **114**: 53-61.
- Aly R, Argaman M, Halman S, Shapira M:** A regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* 1994; **22**: 2922-9.
- Ansari-Lari MA & Gibbs RA:** Expression of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase in trans during virion release and after infection. *J Virol.* 1996; **70**: 3870-75.
- Arkhipova L & Meselson M:** Transposable elements in sexual and ancient asexual taxa. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; **97**: 14473-77.

- Bae YA, Moon SY, Kong X, CHO SY, Rhyu MG:** *CsRn1*, a novel active retrotransposon in a parasitic trematode, *Clonorchis sinensis*, discloses a new phylogenetic clade of *Ty3/gypsy*-like LTR retrotransposons. *Mol Biol Evol.* 2001; **18**: 1474-83.
- Basch PF:** Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro. II. production of infertile eggs by worm pairs cultured from cercariae. *J Parasitol.* 1981; **67**: 186-90.
- Basch PF & Humbert R:** Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro. III. implantation of cultured worms into mouse mesenteric veins. *J Parasitol.* 1981; **67**: 191-5.
- Bayne MJ, Menino JS, Hobbs DJ, Barnes DW:** In vitro cultivation of cells from larval *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol.* 1994; **80**: 29-35.
- Berghammer AJ, Klingler M, Wimmer EA:** A universal marker for transgenic insects. *Nature.* 1999; **402**: 370-1.
- Berkhout B & Jeang KT:** Functional roles for the TATA promoter and enhancers in basal and TAT-induced expression of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J Virol.* 1992; **66**: 139-149.
- Bergquist NR:** Schistosomiasis: from risk assessment to control. *Trends Parasitol.* 2002; **18**: 309-14.
- Bergquist NR & Colley DG:** Schistosomiasis vaccines: research to development. *Parasitol Today.* 1998; **14**: 99-104.
- Bessereau JL, Wright A, Williams DC, Schuske K, Davis MW, Jorgensen EM:** Mobilization of a *Drosophila* transposon in the *Caenorhabditis elegans* germ line. *Nature.* 2001; **413**: 70-4.
- Beuzon CR, Marques S, Casadesus J:** Repression of IS200 transposase synthesis by RNA secondary structures. *Nucleic Acids Research.* 1999; **27**: 3690-95.
- Birnboim HC, Doly A:** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979; **7**: 1513-23.
- Bixler LM, Lerner JP, Ivanchenko M, McCormick RS, Barnes DW, Bayne CJ:** Axenic culture of *Schistosoma mansoni* sporocysts in low O₂ environments. *J Parasitol.* 2001; **87**: 1167-8.
- Blaxter M & Liu L:** Nematode spliced leaders-ubiquity, evolution and utility. *Int J Parasitol.* 1996; **26**: 1025-33.
- Boag PR, Ren P, Newton SE, Gasser RB:** Molecular characterization of male-specific serine/threonine phosphatase from *Oesophagostomum dentatum* (Nematoda: Strongylida). and functional analysis to homologues in *Caenorhabditis elegans*. *Int J Parasitol.* 2003; **33**: 313-25.
- Bond-Matthews B & Davidson N:** Transcription from each of the *Drosophila* act5C leader exons is driven by a separate functional promoter. *Gene.* 1988; **62**: 289-300.
- Bowen NJ, McDonald JF:** Genomic analysis of *Caenorhabditis elegans* reveals ancient families of retrovirus-like elements. *Genome Res.* 1999; **9**: 924-35.

- Boyle JP, Wu Xj, Shoemaker CB, Yoshino TP:** Using RNA interference to manipulate endogenous gene expression in *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; **128**: 205-15.
- Bradford MM:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal Biochem.* 1976; **77**: 248-54.
- Brenin DR, Talamonti MS, Innaccone PM:** Transgenic technology: an overview of approaches useful in surgical research. *Surg Oncol.* 1997; **6**: 99-110.
- Brindley PJ, Kalinna BH, Wong JY, Bogitsh BJ, King LT, Smyth DJ, Verity CK, Abbenante G, Brinkworth RI, Fairlie DP, Smythe ML, Milburn PJ, Bielefeldt-Ohmann H, Zheng Y, McManus DP:** Proteolysis of human hemoglobin by schistosome cathepsin D. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; **112**: 103-12.
- Brindley PJ, Laha T, McManus DP, Loukas A:** Mobile genetic elements colonizing the genomes of metazoan parasites. *Trends Parasitol.* 2003; **19**: 79-87.
- Brindley PJ, Kalinna BH, Dalton JP, Wong JY, Smythe ML, McManus DP:** Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 1997; **89**: 1-9.
- Britton C, Redmond DL, Knox DP, McKerrow JH, Barry JD:** Identification of promoter elements of parasite nematode genes in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biochem Parasitol.* 1999; **15**: 171-81.
- Brooks DR & Isaac RE:** Functional genomics of parasitic worms: the dawn of a new area. *Parasitol Int.* 2002; **51**: 319-25.
- Brooks EM, Sheflin LG, Spaulding SW:** Secondary Structure in the 3'UTR of EGF and the choice of reverse transcriptase affect the detection of message diversity by RT-PCR. *Biotechniques.* 1995; **19**: 806-15.
- Brophy PM & Pritchard DI:** Parasitic helminth glutathione S-transferases: an update on their potential as targets for immuno- and chemotherapy. *Exp Parasitol.* 1994; **79**: 89-96.
- Burglin TR, Lobos E, Blaxter ML:** *Caenorhabditis elegans* as a model for parasitic nematodes. *Int J Parasitol.* 1998; **28**: 395-411.
- Burns DP, Collignon C, Desrosiers RC:** Simian immunodeficiency virus mutants resistant to serum neutralization arise during persistent infection of rhesus monkeys. *J Virol.* 1993; **67**: 4104-13.
- Busek SU, Fantappie M, Malaquias LC, Wilson RA, Correa-Oliveira R, Oliveira GC:** Cis-acting elements, CArG-, E-, CCAAT- and TATA-boxes may be involved in sexually regulated gene transcription in *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; **97**: 85-90.

- Butow RA, Henke RM, Moran JV, Belcher SM, Perlman PS:** Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria using the biolistic gun. *Methods Enzymol.* 1996; **264**: 265-78.
- Callaerts P, Munoz-Marmol AM, Glardon S, Castillo E, Sun H, Li WH, Gehring WJ, Salo E:** Isolation and expression of a Pax-6 gene in the regenerating and intact Planarian *Dugesia tigrina*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; **19**: 558-63.
- Callaerts P, Halder G, Gehring WJ:** PAX-6 in development and evolution. *Annu Rev Neurosci.* 1997; **20**: 483-532.
- Capron A, Capron M, Dombrowicz D, Riveau G:** Vaccine strategies against schistosomiasis: From concepts to clinical trials. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001; **124**: 9-15.
- Capron A, Riveau G, Grzych JM, Boulanger D, Capron M, Pierce R:** Development of a vaccine strategy against human and bovine schistosomiasis. Background and update. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1995; **90**: 235-40.
- Carvalho M & Derse D:** Mutational analysis of the equine infectious anemia virus TAT-responsive element. *J Virol.* 1991; **65**: 3468-74.
- Casero MC & Sastre L:** Characterization of a functional serum response element in the Actin403 gene promoter from the crustacean *Artemia franciscana*. *Eur J Biochem.* 2001; **268**: 2587-92.
- Chaboissier MC, Bornecque C, Busseau I, Bucheton A:** A genetically tagged, defective I element can be complemented by actively transposon I factors in the germline of I-R dysgenic females in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet.* 1995; **248**: 434-8.
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W:** The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature.* 1994; **371**: 215-220.
- Charrier-Ferrara S, Caillol D, Goudot-Crozel V:** Complete sequence of the *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene encoding a major surface antigen. *Mol Biochem Parasitol.* 1992; **56**: 339-43.
- Cheever AW, Macedonia JG, Mosimann JE, Cheever EA:** Kinetics of egg production and egg excretion by *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* in mice infected with a single pair of worms. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; **50**: 281-95.
- Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L:** The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop.* 2000; **77**: 41-51.
- Chlichlia K, Bahgat M, Schirmacher V, Ruppel A:** Species-restricted antibody response against DNA-construct coding for aspartic proteinase from *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Res.* 2002; **88**: 368-75.
- Chow KL & Schwartz RJ:** A combination of closely associated positive and negative cis-acting promoter elements regulates transcription of skeletal alpha-actin gene. *Mol Cell Biol.* 1990; **10**: 528-38.

- Chung YT & Keller EB:** Regulatory elements mediating transcription from *Drosophila melanogaster* actin 5C proximal promoter. Mol Cell Biol. 1990; **10**: 206-16.
- Cioli D & Pica-Mattoccia L:** Praziquantel. Parasitol Res. 2003; **90**: 3-9.
- Cioli D, Pica-Mattoccia L, Archer S:** Antischistosomal drugs: past, present and future ? Pharmacol Ther. 1995; **68**: 35-85.
- Coates CJ, Jasinskiene N, Miyashiro L, James AA:** Mariner transposition and transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; **95**: 3748-51.
- Colley DG, LoVerde PT, Savioli L:** Medical helminthology in the 21st century. Science. 2001; **293**: 1437-8.
- Copeland CS, Brindley PJ, Heyers O, Michael SF, Johnston DA, Williams DJ, Ivens A, Kalinna BH:** *Boudicca*, a retrovirus-like long terminal repeat retrotransposons from the genome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. J Virol. 2003; **77**: 6153-6166.
- Cormack B, Valdivia R, Falkow S:** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). Gene. 1996; **173**: 33-38.
- Cormack BP, Bertram G, Egerton M, Gow NA, Falkow S, Brown AJ:** Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. Microbiology. 1997; **143**: 303-11.
- Coustau C & Yoshino TP:** Flukes without snails: advances in the in vitro cultivation of intramolluscan stages of trematodes. Exp Parasitol. 2000; **94**: 62-6.
- Coustau C, Ataev G, Jourdane J, Yoshino TP:** *Schistosoma japonicum*: in vitro cultivation of miracidium to daughter sporocyst using a *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line. Exp Parasitol. 1997; **87**: 77-87.
- Craigie R:** HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. J Biol Chem. 2001; **276**: 23213-6.
- Craigie R & Mizuuchi K:** Mechanism of transposition of bacteriophage *Mu*: structure of a transposition intermediate. Cell. 1985; **41**: 867-76.
- Crameri A, Whitehorn EA, Tate E, Stemmer WPC:** Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. Nat Biotechnol. 1996; **14**: 315-9.
- Crompton DWT:** How much human helminthiasis is there in the world? J. Parasitol. 1999; **85**: 397-403.
- Cubitt AB, Heim R, Adams S, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY:** Understanding, improving and using green fluorescent protein. Trends Biochem Sci. 1995; **20**: 448-55.
- Czerny T und Busslinger M:** DNA-binding and transactivation properties of Pax-6: Three amino acids in the paired domain are responsible for the different sequence recognition of Pax-6 and BSAP (Pax-5). Moll Cell Biol. 1995; **15**: 2858-71.

- Dahler A, Wade RP, Muscat GE, Waters MJ:** Expression vectors encoding human growth hormone (hGH) controlled by human muscle-specific promoters: prospects for regulated production of hGH delivered by myoblast transfer or intravenous injection. *Gene*. 1994; **145**: 305-10.
- Daniell H:** Foreign gene expression in chloroplasts of higher plants mediated by tungsten particle bombardment. *Methods Enzymol*. 1993; **217**: 536-56.
- Davidson JM, Krieg T, Eming SA:** Particle-mediated gene therapy of wounds. *Wound Repair Regen*. 2000. 452-9.
- Davis RE, Parra A, LoVerde PT, Ribeiro E, Glorioso G, Hodgson S:** Transient expression of DNA and RNA in parasitic helminths by using particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; **96**: 8687-92.
- Davis RE, Hardwick C, Tavernier P, Hodgson S, Singh H:** RNA trans-splicing in flatworms. Analysis of trans-spliced mRNAs and genes in human parasite, *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem*. 1995; **270**: 21813-9.
- de Jesus AR, Silva A, Santana LB, Magalhaes A, de Jesus AA, de Almeida RP, Rego MA, Burattini MN, Pearce EJ, Carvalho EM:** Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis*. 2002; **185**: 98-105.
- Deininger PL & Batzer MA:** Mammalian retroelements. *Genome Res*. 2002; **12**: 1455-65.
- Dej KJ, Gerasimova VG, Corces VG, Boeke JD:** A hotspot for the *Drosophila gypsy* retroelement in the ovo locus. *Nucleic Acids Res*. 1998; **26**: 4019-25.
- Den Hollander JE, Erasmus DA:** *Schistosoma mansoni*: DNA synthesis in males and females from mixed and single-sex infections. *Parasitology*. 1984; **88**: 463-76.
- Derse D, Caradonna SJ, Casey JW:** Bovine leukemia virus long terminal repeat: a cell type-specific promoter. *Science*. 1985; **227**: 317-20.
- Dias Neto E, Correa RG, Verjovski-Almeida S, Briones MR, Nagai MA, da Silva W Jr, Zago MA, Bordin S, Costa FF, Goldman GH, Carvalho AF, Matsukuma A, Baia GS, Simpson DH, Brunstein A, de Oliveira PS, Bucher P, Jongeneel CV, O'Hare MJ, Soares F, Brentani RR, Reis LF, de Souza SJ, Simpson AJ:** Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; **97**: 3491-6.
- Doehring E:** Schistosomiasis in childhood. *Eur J Pediatr*. 1988; **147**: 2-9.
- Doenhoff MJ, Kusel JR, Coles GC, Cioli D:** Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem ? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002; **96**: 465-9.
- Doherty JF, Moody AH, Wright SG:** Katayama fever: an acute manifestation of schistosomiasis. *BMJ*. 1996; **313**: 1001-2.

- Donald RG & Roos DS:** Gene knock-outs and allelic replacements in *Toxoplasma gondii*: HXGPRT as a selectable marker for hit-and-run mutagenesis. *Mol Biochem Parasitol.* 1998; **91**: 295-303.
- Donald RG & Roos DS:** Insertional mutagenesis and marker rescue in a protozoan parasite: cloning of the uracil phosphoribosyltransferase locus from *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; **92**: 5749-53.
- Dorn A, Bollekens J, Staub A, Benoist C, Mathis D:** A multiplicity of CCAAT box-binding proteins. *Cell.* 1987; **50**: 863-72.
- Drew AC, Minchella DJ, King LT, Rollinson D, Brindley PJ:** SR2, non-long terminal repeat retrotransposon of the *RTE-1* lineage from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Mol Biol Evol.* 1999; **16**: 1256-69.
- Drew AC & Brindley PJ:** A retrotransposon of the long-terminal repeat class from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. Similarities with the chicken repeat 1-like elements from vertebrates. *Mol Biol Evol.* 1997; **14**: 602-10.
- D'Souza UM, Wang W, Gao DQ, Kanda S, Lee G, Junn E, Hwang CK, Jose PA, Mouradian MM:** Characterization of the 5' flanking region of the rat D(3) dopamine receptor gene. *J Neurochem.* 2001; **76**: 1736-44.
- Emmons SW, Yesner L, Ruan K, Katzenberg D:** Evidence for a transposon in *Caenorhabditis elegans*. *Cell.* 1983; **32**: 55-65.
- Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L:** The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Tropica.* 2002; **82**: 139-46.
- Fan J, Minchella DJ, Day SR, McManus DP, Tiu WU, Brindley PJ:** Generation, identification and evaluation of expressed sequence tags from different developmental stages of the Asian blood fluke *Schistosoma japonicum*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; **252**: 348-56.
- Farooq N:** Historical development. Epidemiology and control of schistosomiasis. Ansari N: S. Karger, Basel, 1973, 1-16.
- Feng S & Holland EC:** HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature.* 1988; **334**: 165-7.
- Finnegan EJ, Taylor BH, Craig S, Dennis ES:** Transposable elements can be used to study cell lineages in transgenic plants. *Plant Cell.* 1989; **1**: 757-64.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC:** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998; **391**: 806-11.
- Fire A:** Histochemical techniques for locating *Escherichia coli* beta-galactosidase activity in transgenic organisms. *Gent Anal Tech Appl.* 1992; **9**: 151-8.

- Fire A, Harrison SW, Dixon:** A modular set of lacZ fusion vectors for studying gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*. 1990; **93**: 189-98.
- Franco GR, Valadao AF, Azevedo V, Rabelo EM:** The *Schistosoma* gene discovery: state of the art. *Int J Parasitol*. 2000; **30**: 453-63.
- Franco GR, Rabelo EML, Azevedo V, et al:** Evaluation of cDNA libraries from different developmental stages of *Schistosoma mansoni* for production of expressed sequence tags (ESTs). *DNA Res*. 1997; **4**: 231-40.
- Franco GR, Adams MD, Soares MB, Simpson AJ, Venter JC, Pena SD:** Identification of new *Schistosoma mansoni* genes by the EST strategy using a directional cDNA library. *Gene*. 1995; **152**: 141-7.
- Fujiwara T & Mizuuchi K:** Retroviral DNA integration: structure of an integration intermediate. *Cell*. 1988; **54**: 497-504.
- Gabriel B, & Teissie J:** Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electropermeabilized cell membrane. *Biophys J*. 1997; **73**: 2630-37.
- Gad A, Tanaka E, Orie K, Rokuhara A, Nooman A, Serwah H, Shoair M, Yoshizawa K, Kiyosawa K:** Relationship between hepatitis C virus infection and schistosomal liver disease: not simply an additive effect. *J Gastroenterol*. 2001; **36**: 753-58.
- Gallie DR:** The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev*. 1991; **5**: 2108-16.
- Garcia-Fernandez J, Bayascas-Ramirez JR, Marfany G, Munoz-Marmol AM, Casali A, Baguna J, Salo E:** High copy number of highly similar *mariner*-like transposons in planarian (Platyhelminthe): evidence for a trans-phyla horizontal transfer. *Mol Biol Evol*. 1995; **12**: 421-431.
- Gehl J:** Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol Scand*. 2003; **177**: 437-47.
- Gluzman Y:** SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*. 1981; **23**: 175-82.
- Gomez-Escobar N, Gregory WF, Britton C, Murray L, Carton C, Hall N, Daub J, Blaxter ML, Maizels RM:** Abundant larval transcript-1 and -2 genes from *Brugia malayi*: diversity and genomic environments but conservation of 5' promoter sequences functional in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biochem Parasitol*. 2002; **125**: 59-71.
- Goonewardene R, Daily J, Kaslow D, Sullivan TJ, Duffy P, Carter R, Mendis K, Wirth D:** Transfection of malaria parasite and expression of firefly luciferase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; **90**: 5234-6.

- Goyard S, Tosi LR, Gouzova J, Majors J, Beverley SM:** New *Mos1 mariner* transposons suitable for the recovery of gene fusions in vivo and in vitro. *Gene*. 2001; **280**: 97-105.
- Grevelding CG, Kampkotter A, Kunz W:** *Schistosoma mansoni*: sexing cercariae by PCR without DNA extraction. *Exp Parasitol*. 1997; **85**: 99-100.
- Gross LA, Baird GS, Hoffman RC, Baldrige KK, Tsien RY:** The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; **97**: 11990-5.
- Grossman AI, Short RB, Kuntz RE:** Somatic chromosomes of *Schistosoma rodhaini*, *S. matteei* and *S. intercalatum*. *J Parasitol*. 1981a; **67**: 41-4.
- Grossman AI, Short RB, Cain GD:** Karyotype evolution and sex chromosome differentiation in schistosomes (Trematoda, Schistosomatidae). *Chromosoma*. 1981b; **84**: 413-30.
- Gueiros-Filho FJ & Beverley SM:** Transkingdom transposition of the *Drosophila* element *mariner* within the protozoan *Leishmania*. *Science*. 1997; **276**: 1716-9.
- Haas J, Park E-C, Seed B:** Codon usage limitation in the expression of *HIV-1* envelope glycoprotein. *Curr. Biol*. 1996; **6**: 315-24.
- Haas W, Diekhoff D, Koch K, Schmalfuss G, Loy C:** *Schistosoma mansoni* cercariae: stimulation of acetabular gland secretion is adapted to the chemical composition of mammalian skin. *J Parasitol*. 1997; **83**: 1079-85.
- Hanahan D:** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1985; **166**: 557-580.
- Hansen EL:** Secondary daughter sporocysts of *Schistosoma mansoni*: their occurrence and cultivation. *Ann N Y Acad Sci*. 1975; **266**: 426-36.
- Hansen EL:** A cell line from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Int J Commun Syst*. 1974; **2**: 1703.
- Hara T, Yasuda K, Fukuma T:** Effective gene transfer into *Trypanosoma brucei* bloodstream forms by particle bombardment. *Mol Biochem Parasitol*. 2002; **119**: 117-9.
- Haseloff S, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S:** Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; **94**: 2122-27.
- Hashmi S, Tawe W, Lustigman S:** *Caenorhabditis elegans* and study of gene function in parasites. *Trends Parasitol*. 2001; **17**: 387-93.
- Hedstrom R, Culepper J, Harrison RA, Agabian N, Newport G:** A major immunogen in *Schistosoma mansoni* infections is homologous to the heat-shock protein HSP70. *J Exp Med*. 1987; **165**: 1430-5.

- Hemmings-Mieszczak M & Hohn T:** A stable hairpin preceded by a short open reading frame promotes nonlinear ribosome migration on a synthetic mRNA leader. *RNA*. 1999; **5**: 1149-57.
- Higashijima S, Okamoto H, Ueno N, Hotta Y, Eguchi G:** High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin. *Dev Biol*. 1997; **192**: 289-99.
- Higazi TB, Merriweather A, Shu L, Davis R, Unasch TR:** *Brugia malayi*: transient transfection by microinjection and particle bombardment. *Exp Parasitol*. 2002; **100**: 95-102.
- Hirai M, Taguchi T, Itoh SAY, Kawanaka M, Sugiyama H, Habe S, Okamoto M, Hirata M, Shimada M, Tiu WU, Lai K, Upatham ES, Agatsuma T :** Chromosomal differentiation of the *Schistosoma japonicum* complex. *Int J Parasitol*. 2000; **30**: 441-52.
- Hobbs DJ, Fryer SE, Duimstra JR, Hedstrom OR, Brodie AE, Colladi PA, Menino JS, Bayne CJ, Barnes DW:** Culture of cells from juvenile worms of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol*. 1993; **79**: 913-21.
- Hoffmann KF, Johnston DA, Dunne DW:** Identification of *Schistosoma mansoni* gender-associated gene transcripts by cDNA microarray profiling. *Genome Biol*. 2002; **3**: RESEARCH0041.
- Hohn T, Corsten S, Dominguez D, Fütterer J, Kirk D, Hemmings-Mieszczak M, Pooggin M, Schärfer-Hernandez N, Ryabova L:** Shunting is a translation strategy used by plant pararetroviruses (Caulimoviridae). *Micron*. 2001; **32**: 51-7.
- Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W:** Atomic model of the actin filament. *Nature*. 1990; **347**: 44-9.
- Holy JM, O'Leary KA, Oaks JA, Tracy JW:** Immunocytochemical localization of the major glutathione S-transferases in *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol*. 1989; **75**: 181-90.
- Horn C & Wimmer EA:** A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev Genes Evol*. 2000; **210**: 630-7.
- Horn C, Jaunich B, Wimmer EA:** Highly sensitive, fluorescent transformation marker for *Drosophila* transgenesis. *Dev Genes Evol*. 2000; **210**: 623-9.
- Ismail M, Botros S, Metwally A, William S, Farghally A, Tao LF, Day TA, Bennett JL:** Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; **60**: 932-5.
- Ivanchenko MG, Lerner JP, McCormick RS, Toumadje A, Allen B, Fischer K, Hedstrom O, Helmrich A, Barnes DW, Bayne CJ:** Continuous in vitro propagation and differentiation of cultures of the intramolluscan stages of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; **96**: 4965-70.
- Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvak Z:** Molecular reconstruction of *Sleeping Beauty*, a *Tc1*-like transposon from fish and its transposition in human cells. *Cell*. 1997; **91**: 501-10.

- Izsvak Z, Ivics Z, Plasterk RH:** *Sleeping Beauty*, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *J Mol Biol.* 2000; **302**: 93-102.
- Jackstadt P, Wilm TP, Zahner H, Hobom G:** Transformation of nematodes via ballistic DNA transfer. *Mol Biochem Parasitol.* 1999; **103**: 261-6.
- Jakopson JW, Medhora MM, Hartl DH:** Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; **83**: 8684-88.
- Johnston DA, Blaxter ML, Degraeve WM, Foster J, Ivens AC, Melville SE:** Genomics and the biology of parasites. *Bioessays.* 1999; **21**: 131-47.
- Johnston SA:** Biolistic transformation: microbes to mice. *Nature.* 1990; **346**: 776-7.
- Jones CS, Lockyer AE, Rollinson D, Noble LR:** Molecular approaches in the study of *Biomphalaria glabrata*-*Schistosoma mansoni* interactions: linkage analysis and gene expression profiling. *Parasitology.* 2000; **123**: 181-96.
- Jourdane J, Liang YS, Bruce JI:** Transplantation of *Schistosoma japonicum* daughter sporocysts in *Oncomelania hypensis*. *J Parasitol.* 1985; **71**: 244-7.
- Jourdane J, Theron A, Combes C:** Demonstration of several sporocysts generations as a normal pattern of reproduction of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.* 1980; **37**: 177-82.
- Jung F, Johnson AD, Kumar MS, Wei B, Hautmann M, Owens GK, McNamara C:** Characterization of an E-box-dependent cis element in the smooth muscle alpha-actin promoter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; **19**: 2591-9.
- Kaiser J:** Gene therapy. RAC hears a plea for resuming trials, despite cancer risk. *Science.* 2003; **299**: 991.
- Kampkotter A, Volkmann TE, de Castro SH, Leiers B, Klotz LO, Johnson TE, Link CD, Henkle-Duhrsen K:** Functional analysis of the glutathione S-transferase 3 from *Tc1* (Ov-GST-3): a parasite GST confers increased resistance to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol.* 2003; **325**: 25-37.
- Kar-Roy A, Dong W, Michael N, Li Y:** Green fluorescence protein as a transcriptional reporter for long terminal repeats of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol Methods.* 2000; **84**: 127-38.
- Kashanchi F, Shibata R, Ross EK, Brady JN, Martin MA:** Second-site long terminal repeat (LTR) revertants of replication-defective human immunodeficiency virus: effects and revertant TATA box motifs on virus infectivity, LTR directed expression, in vitro RNA synthesis and binding of basal transcription factors TFIID and TFIIA. *J Virol.* 1994; **68**: 3298-307.
- Kawanaka M, Hayachi S, Carter CE:** Uptake and excretion of amino acids and utilization of glucose by *Schistosoma japonicum* eggs. *Jpn J Med Sci Biol.* 1989; **39**: 199-206.
- Khalife J, Godin C, Capron A:** Transcriptional regulation of *Schistosoma mansoni* calreticulin: possible role for AP-1. *Parasitology.* 1995; **111**: 469-75.

- Khalife J, Liu JL, Pierce R, Porchet E, Godin C, Capron A:** Characterization and localization of *Schistosoma mansoni* calreticulin Sm58. *Parasitology*. 1994; **108**: 527-32.
- Khalife J, Pierce RJ, Godin C, Capron A:** Cloning and sequencing of the gene encoding the *Schistosoma mansoni* calreticulin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993; **62**: 313-6.
- King CH, Muchiri EM, Ouma JH:** Evidence against rapid emergence of praziquantel resistance in *Schistosoma haematobium*, Kenya. *Emerg Infect Dis.* 2000; **6**: 585-94.
- Klein TM & Fitzpatrick-McElligott S:** Particle bombardment: a universal approach for gene transfer to cells and tissues. *Curr Opin Biotechnol.* 1993; **4**: 583-90.
- Knight M, Ongele E, Lewis FA:** Molecular studies of *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol.* 2000; **30**: 535-41.
- Knight M, Miller AN, Patterson CN, Rowe CG, Michaels G, Carr D, Richards CS, Lewis FA:** The identification of markers segregating with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in the snail *Biomphalaria glabrata*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; **96**: 1510-5.
- Kocken CH, Ozwara H, van der Wel A, Beetsma AL, Mwenda JM, Thomas AW:** *Plasmodium knowlesi* provides a rapid in vitro and in vivo transfection system that enables double-crossover gene knockout studies. *Infect Immun.* 2002; **70**: 655-60.
- Kokoza V, Ahmed A, Wimmer EA, Raikhel AS:** Efficient transformation of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* using the *piggyBac* transposable element vector pBac(3xP3-EGFPafm). *Insect Biochem Mol Biol.* 2001; **31**: 1137-43.
- Kovacs AM & Zimmer WE:** Cell-specific transcription of the smooth muscle gamma-actin gene requires both positive- and negative-acting cis elements. *Gene Expr.* 1998; **7**: 115-29.
- Krause S, Sommer A, Fischer P, Brophy PM, Walter RD, Liebau E:** Gene structure of the extracellular glutathione-S-transferase from *Onchocerca volvulus* and its overexpression and promoter analysis in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; **117**: 145-54.
- Kumar MS, Hendrix JA, Johnson AD, Owens GK:** Smooth muscle alpha-actin gene requires two E-boxes for proper expression in vivo and is target of class I basic helix-loop-helix proteins. *Circ Res.* 2003; **92**: 840-7.
- Kusakabe R, Kusakabe T, Suzuki N:** In vivo analysis of two striated muscle actin promoters reveals combination of multiple regulatory modules required for skeletal and cardiac muscle-specific gene expression. *Int J Dev Biol.* 1999; **43**: 541-44.
- Kusakabe T:** Ascidian actin genes: developmental regulation of gene expression and molecular evolution. *Zoolog Sci.* 1997; **14**: 707-18.
- Kusel JR, Gazzinelli G, Colley DG, de Souza CP, Cordeiro MN:** The formation of surface membrane vesicles from schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology.* 1984; **89**: 483-94.

- Laemmli UK:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; **227**: 680-685.
- Laha T, Brindley PJ, Smout MJ, Verity CK, McManus DP, Loukas A:** Reverse transcriptase activity and UTR sharing of a new RTE-like, non-LTR retrotransposon from the human blood fluke *Schistosoma japonicum*. *Int J Parasitol*. 2002a; **32**: 1163-74.
- Laha T, Brindley PJ, Verity CK, Mc Manus DP, Loukas A:** *Pido*, a non-long terminal repeat retrotransposon of the chicken repeat 1 family from the genome of the oriental blood fluke *Schistosoma japonicum*. *Gene*. 2002b; **284**: 149-59.
- Laha T, Loukas A, Verity CK, McManus DP, Brindley PJ:** *Gulliver*, a long terminal repeat retrotransposon from the genome of the oriental blood fluke *Schistosoma japonicum*. *Gene*. 2001; **264**: 59-68.
- Lambertucci JR, Serufo JC, Gerspacher-Lara R, Rayes AA, Teixeira R, Nobre V, Antunes CM:** *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. *Acta Trop*. 2000; **77**: 101-9.
- Lambertucci JR:** Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1993; **35**: 399-404.
- Lampe DJ, Grant TE, Robertson HM:** Factors affecting transposition of *Himar1* mariner transposon in vitro. *Genetics*. 1998; **149**: 179-87.
- Lampe DJ, Churchill ME, Robertson HM:** A purified *mariner* transposase is sufficient to mediate transposition in vitro. *EMBO J*. 1996; **15**: 5470-79.
- Lawrence JD:** The ingestion of red blood cells by *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol*. 1973; **59**: 60-63.
- Le Paslier MC, Pierce RJ, Merlin F, Hirai H, WU W, Williams DL, Johnston D, LoVerde PT, Le D Paslier:** Construction and characterization of a *Schistosoma mansoni* bacterial artificial chromosome library. *Genomics*. 2000; **65**: 87-94.
- Lemos QT & Andrade ZA:** Sequential histological changes in *Biomphalaria glabrata* during the course of *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001; **96**: 719-21.
- Levy-Holtzman R & Schechter I:** Expression of different forms of the heat-shock factor during the life cycle of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *Biochim Biophys Acta*. 1996; **1317**: 1-4.
- Levy-Holtzmann R & Schechter I:** Activity of the promotor of the hsp 70 gene of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni* in the mammalian *CHO* cell-line. *Biochim. Biophys Acta*. 1995; **1263**: 96-98.
- Linder E & Thors C:** *Schistosoma mansoni*: praziquantel-induced tegumental lesion exposes actin of surface spines and allows binding of actin depolymerizing factor, gelsolin. *Parasitology*. 1992; **105**: 71-9.
- Liu JL, Fontaine J, Capron A, Grzych JM:** Ultrastructural localization of Sm28 GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology*. 1996; **113**: 377-91.

- Lohr JL & Yost HJ:** Vertebrate model systems in the study of early heart development: *Xenopus* and zebrafish. *Am J Med Genet.* 2000; **97**: 248-57.
- Loike JD & Silverstein SC:** A fluorescence quenching technique using trypan blue to differentiate between attached and ingested glutaraldehyde-fixed red blood cells in phagocytosing murine macrophages. *J Immunol Methods.* 1983; **57**: 373-9.
- Lok JB & Massey HC:** Transgene expression in *Strongyloides stercoralis* following gonadal microinjection of DNA constructs. *Mol Biochem Parasitol.* 2002; **119**: 279-84.
- Lorito M, Hayes CK, Di Pietro A, Harman GE:** Biolistic transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. *Curr Genet.* 1993; **24**: 349-56.
- Luchtel DL, Martin AW, Deyrup-Olsen I, Boer HH:** Gastropoda: Pulmonata. *Microscopic Anatomy of Invertebrates.* 449-718, Harrison FW, Kohn AJ: Volume 6b Mollusca II Wiley-Liss, New York, USA, 1997
- Luo G, Ivics Z, Izsvak Z, Bradley A:** Chromosomal transposition of a *TC1/mariner*-like element in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; **95**: 10769-73.
- MacGregor AN & Shore SJ:** Immunocytochemistry of cytoskeletal proteins in adult *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol.* 1990; **20**: 279-84.
- Magnussen P:** Treatment and re-treatment strategies for schistosomiasis control in different epidemiological settings: a review of 10 years' experiences. *Acta Trop.* 2003; **86**: 243-54.
- Malik HS & Eickbush TH:** Phylogenetic analysis of ribonuclease H domains suggests a late, chimeric origin of LTR retrotransposable elements and retroviruses. *Genome Res.* 2001; **11**: 1187-97.
- Mamoun CB, Gluzman IY, Beverley SM, Goldberg DE:** Transposition of the *Drosophila* element *mariner* within the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2000; **110**: 405-7.
- Mamoun CB, Gluzman IY, Goyard S, Beverley SM, Goldberg DE:** A set of independent selectable markers for transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; **96**: 10944.
- Maroney PA, Denker JA, Darzynkiewicz E, Laneve R, Nilsen TW:** Most mRNAs in the nematode *Ascaris lumbricoides* are trans-spliced: a role for spliced leader addition in translational efficiency. *RNA.* 1995; **1**: 714-23.
- Marsh, Carson JA, Stewart LN, Booth FW:** Activation of the skeletal alpha-actin promoter during muscle regeneration. *J Muscle Res Cell Motil.* 1998; **19**: 897-907.
- McKerrow JH, Pino-Heiss S, Lindquist RL, Werb Z:** Purification and characterization of an elastinolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem.* 1985; **260**: 3703-07.

- McNair AT, Dissous C, Duvaux-Miret O, Capron A:** Cloning and characterization of a gene encoding the 28-kDa Glutathione S-transferase of *Schistosoma mansoni*. *Gene*. 1993; **124**: 245-9.
- Medhora MM, Maruyama K, Hartl DH:** Molecular and functional analysis of the *mariner* mutator element *Mos1* in *Drosophila*. *Genetics*. 1991; **128**: 311-8.
- Meira WS, Franco GR, Rabelo EM, Pena SD:** Characterization of an abundant *Schistosoma mansoni* transcript with no homologs in the databases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998; **93**: 211-3.
- Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, Ambros V:** Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J*. 1991; **10**: 3959-70.
- Merrick JM, Osman A, Tsai J, Quackenbush J, LoVerde PT, Lee NH:** The *Schistosoma mansoni* gene index: gene discovery and biology by reconstruction and analysis of expressed gene sequences. *J Parasitol*. 2003; **89**: 261-9.
- Miller AD & Rosman GJ:** Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques*. 1989; **7**: 980-2. 984-6. 989-90.
- Misslitz A, Mottram JC, Overath P, Aebischer T:** Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 2000; **107**: 251-61.
- Mohun TJ, Taylor MV, Garrett N, Gurdon JB:** The CArG promoter sequence is necessary for muscle-specific transcription of the cardiac actin gene in *Xenopus* embryos. *EMBO J*. 1989; **8**: 1153-61.
- Montgomery MK, Xu S, Fire A:** RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; **95**: 15502-7.
- Morgan JA, Dejong RJ, Snyder SD, Mkoji GM, Loker ES:** *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past, history and future trends. *Parasitology*. 2001; **123**: 211-28.
- Moseley PL, Wallen ES, McCafferty JD, Flanagan S, Kern JA:** Heat stress regulates the human 70-kDa heat-shock gene through the 3'-untranslated region. *Am J Physiol*. 1993; **264**: L533-7.
- Mullis RB & Faloona FA:** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987; **155**: 335-50.
- Neumann E, Kakorin S, Tsoneva I, Nikolova B, Tomov T:** Calcium-mediated DNA adsorption to yeast cells and kinetics of cell transformation by electroporation. *Biophys J*. 1996; **71**: 868-77.
- Neumann S, Ziv E, Lantner F, Schechter I:** Regulation of HSP70 gene expression during the life cycle of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *Eur J Biochem*. 1993; **212**: 589-96.
- Neumann S, Ziv E, Lantner F, Schechter I:** Cloning and sequencing of an hsp70 gene of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*. 1992; **56**: 357-60.

- Niswender KD, Blackman SM, Rohde L, Magnuso MA, Piston DW:** Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits. *J Microsc.* 1995; **180**: 109-16.
- O'Brochta DA & Atkinson PW:** Transposable elements and gene transformation in non-drosophilid insects. *Insect Biochem Mol Biol.* 1996; **26**: 729-53.
- Ochman H, Ayala FJ, Hartl DL:** Use of polymerase chain reaction to amplify segments outside boundaries of known sequences. *Methods Enzymol.* 1993; **218**: 26-35.
- O'Connor MJ & Chia W:** Gene transfer in *Drosophila*. *Methods Mol Biol.* 2002; **180**: 27-36.
- Ogura T:** In vivo electroporation: a new frontier for gene delivery and embryology. *Differentiation.* 2002; **70**: 163-71.
- Okkema PG, Harrison SW, Plunger V, Aryana A, Fire A:** Sequence requirements for myosin expression and regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 1993; **135**: 385-404.
- Okuno T, Goto Y, Matsumoto Y, Otsuka H, Matsumoto Y:** Applications of recombinant *Leishmania amazonensis* expressing egfp and the beta-galactosidase for drug screening and histopathological analysis. *Exp Anim.* 2003; **52**: 109-18.
- O'Leary KA & Tracy JW:** *Schistosoma mansoni*: glutathione S-transferase-catalyzed detoxication of dichlorvos. *Exp Parasitol.* 1991; **72**: 355-61.
- Oliveira GC & Kemp WM:** Cloning of two actin genes from *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol.* 1995; **75**: 119-22.
- Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ:** Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science.* 1996; **273**: 1292-95.
- Pan SC:** The fine structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni*. *J Invertebr Pathol.* 1980; **36**: 307-72.
- Pantazidis A, Labrador M, Fontdevilla A:** The retrotransposon *Osvaldo* from *Drosophila buzzatii* displays all structural features of a functional retrovirus. *Mol Biol Evol.* 1999; **16**: 909-921.
- Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY:** Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int J Parasitol.* 2000; **30**: 1395-405.
- Pereira C, Fallon P, Cornette J, Capron A, Doenhoff MJ, Pierce RJ:** Alterations in cytochrome-c oxidase expression between praziquantel-resistant and susceptible strains of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology.* 1998; **117**: 63-73.
- Petrov DA, Sangster TA, Johnston S, Hartl DL, Shaw KL:** Evidence for DNA loss as a determinant of genome size. *Science.* 2000; **287**: 1060-62.
- Piccin A, Salameh A, Benna C, Sandrelli F, Mazzotta G, Zordan M, Rosato E, Kyriacou CP, Costa R:** Efficient and heritable functional knock-out of an adult phenotype in *Drosophila* using a GAL4-driven hairpin RNA incorporating a heterologous spacer. *Nucleic Acids Res.* 2001; **29**:

E55-5.

Pichaud F und Desplan C: Pax genes and eye organogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2002; **12**: 430-4.

Pineda D, Rossi L, Batistoni R, Salvetti A, Marsal M, Gremigni V, Falleni A, Gonzalez-Linares J, Deri P, Salo E: The genetic network of prototypic planarian eye regeneration is Pax6 independent. *Development.* 2002; **129**: 1423-34.

Plasterk RH, Izsvak K, Ivics Z: Resident aliens: the *TC1/mariner* superfamily of transposable elements. *Trends Genet.* 1999; **15**: 326-32.

Praitis V, Casey E, Collar D, Austin J: Creation of low-copy integrated transgenic lines in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 2001; **157**: 1217-26.

Prasher DC: Using GFP to see the light. *Trends Genet.* 1995; **11**: 320-3.

Prugnotte F, de Meeus T, Durand P, Sire C, Theron A: Sex-specific genetic structure in *Schistosoma mansoni*: evolutionary and epidemiological implications. *Mol Ecol.* 2002; **11**: 1231-8.

Prugnotte F, Durand P, Theron A, Chevillon C, de Meeus T: Sex-specific genetic structure: new trends for dioecious parasites. *Trends Parasitol.* 2003; **19**: 171-4.

Purdy JE, Mann BJ, Shugart EC, Petri WA Jr: Analysis of the gene family encoding the *Entamoeba histolytica* galactose-specific adhesin 170-kDa subunit. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; **62**: 53-9.

Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T: MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Re.* 1995; **23**: 4878-84.

Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena JM: Identification of a putative regulatory element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol.* 2000; **110**: 79-91.

Raghavan N, Miller AN, Gardner M, FitzGerald PC, Kerlavage AR, Johnston DA, Lewis FA, Knight M: Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre- and post-exposure to miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; **126**: 181-91.

Raman S, Bouma P, Williams GD, Brian DA: Stem-Loop III in the 5' untranslated region is a cis-acting element in bovine coronavirus defective interfering RNA replication. *J Virol.* 2003; **77**: 6720-6730.

Reichel C, Mathur P, Eckes K, Langenkemper C, Koncz J, Schell J, Reiss B, Maas C M: Enhanced green fluorescence by the expression of an *Aequorea* green fluorescent protein mutant in mono- and dicotyledonous plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; **93**: 5888-93.

Rice PA & Baker TA: Comparative architecture of transposase and integrase complexes. *Nat Struct Biol.* 2001; **8**: 302-7.

- Robertson HM:** Multiple *mariner* transposons in flatworms and hydras are related to those in insects. *J Hered.* 1997; **88**: 195-201.
- Robertson HM & Lampe DJ:** Recent horizontal transfer of a *mariner* transposable element among and between Diptera and Neuroptera. *Mol Biol Evol.* 1995; **12**: 850-62.
- Rohou H, Francisci S, Rinaldi T, Frontali L, Bolotin-Fukuhara M:** Reintroduction of a characterized tRNA glycine mutation into yeast mitochondria provides a new tool for the study of human neurodegenerative diseases. *Yeast.* 2001; **18**: 219-27.
- Romeis B:** Mikroskopische Technik. Böck P: Urban und Schwarzenberg, München, Germany,
- Ross AGP, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, Willimas GM, McMagna DP:** Schistosomiasis. *N Engl J Med.* 2002; **346**: 1212-20.
- Rossi A, Wipperfsteg V, Klinkert MQ, Grevelding GC:** Cloning of 5' and 3' flanking regions of the *Schistosoma mansoni* calcineurin A gene and their characterization in transiently transformed parasites. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; **130**: 133-8.
- Ruf S, Kossel H, Bock R:** Targeted inactivation of a tobacco intron containing open reading frame reveals a novel chloroplast-encoded photosystem-I related gene. *J Cell Biology.* 1997; **6**: 95-102.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA:** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; **239**: 487-491.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T:** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edition Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York, 1989.
- Sandmeyer S:** Integration by design. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; **100**: 5586-8.
- Sanford JC, Smith FD, Russell JA:** Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol.* 1993; **217**: 483-509.
- Sanger F, Nicklen A, Coulson AR:** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977; **74**: 5463-5467.
- Santos TM, Johnston DA, Azevedo V, Ridgers IL, Martinez MF, Marotta GB, Santos RL, Fonseca SJ, Ortega JM, Rabelo EM, Saber M, Ahmed HM, Romeih MH, Franco GR, Rollinson D, Pena SD:** Analysis of the gene expression profile of *Schistosoma mansoni* cercariae using the expressed sequence tag approach. *Mol Biochem Parasitol.* 1999; **103**: 79-97.
- Schindelhauer D & Laner A:** Visible transient expression of EGFP requires intranuclear injection of large copy numbers. *Gene Ther.* 2002; **9**: 727-30.
- Scott JC & McManus DP:** Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding major endoplasmic reticulum-associated calcium-binding protein, calreticulin, from Philippine strain *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Int.* 1999; **48**: 35-46.

- Serra E, Zemzoumi K, Dissous C:** Deletion analysis of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa-glutathione S-transferase gene promoter in mammalian cells- importance of a proximal activator-protein-1 site. Eur J Biochem. 1997; **248**: 113-9.
- Serra E, Zemzoumi K, Trolet J, Capron A, Dissous C:** Functional analysis of the *Schistosoma mansoni* 28 kDa-glutathione S-transferase gene promoter: involvement of SMNF-Y transcription factor in multimeric complexes. Mol Biochem Parasitol. 1996; **83**: 69-80.
- Sersa G, Cufer T, Cemazar M, Rebersek M, Zvonimir R:** Electrochemotherapy with bleomycin in the treatment of hypernephroma metastasis: case report and literature review. Tumori. 2000; **86**: 163-165.
- Shabaan AM, Mohamed MM, Abdallah MS, Ibrahim HM, Karim AM:** Analysis of *Schistosoma mansoni* genes using the expressed sequence tag approach. Acta Biochim Pol. 2003; **50**: 259-68.
- Sheng G, Thouvenot E, Schmucker D, Wilson DS, Desplan C:** Direct regulation of rhodopsin 1 by Pax-6/eyeless in *Drosophila*: evidence for a conserved function in photoreceptors. Genes Dev. 1997; **11**: 1122-31.
- Sheterline P & Sparrow J:** Actin. Protein Profile. 1994; **1**: 1-121.
- Short RB & Gagne HT:** Fine structure of possible photoreceptor in cercariae of *Schistosoma mansoni*. J Parasitol. 1975; **61**: 69-74.
- Shu L, Katholi CR, Higazi T, Unasch TR:** Analysis of the *Brugia malayi* HSP70 promoter using homologous transient transfection system. Mol Biochem Parasitol. 2003; **25**: 67-75.
- Simpson AJ, Chaudri M, Knight M, Kelly C, Rumjanek F, Martin S, Smithers SR:** Characterization of the structure and expression of the gene encoding a major female specific polypeptide of *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol. 1987; **22**: 169-76.
- Simpson AJ, Dame JB, Lewis FA, McCutchan TF:** The arrangement of the ribosomal RNA genes in *Schistosoma mansoni*. Identification of polymorphic structural variants. Eur J Biochem. 1984; **139**: 41-45.
- Simpson AJ, Sher A, McCutchan TF:** The genome of *Schistosoma mansoni*: isolation of DNA, its size, bases and repetitive sequences. Mol Biochem Parasitol. 1982; **6**: 125-37.
- Skelly PJ, Da'dara A, Harn DA:** Suppression of cathepsin B expression in *Schistosoma mansoni* by RNA interference. Int J Parasitol. 2003; **33**: 363-9.
- Smetana K:** The nucleolus and nucleolar DNA. The cell nucleus. Busch H: Academic Press, New York, USA, 1974.
- Smit AF:** Identification of a new, abundant superfamily of mammalian LTR-transposons. Nucleic Acids Res. 1993; **21**: 1863-72.
- Snutch TP, Heschl MF, Baillie DL:** The *Caenorhabditis elegans* hsp gene family: a molecular genetic characterization. Gene. 1988; **64**: 241-55.

- Soto U, Das BC, Lengert M, Finzer P, zur Hausen H, Rosl F:** Conversion of HPV 18 positive non-tumorigenic *HeLa*-fibroblast hybrids to invasive growth involves loss TNF- α mediated repression of viral transcription and modification of the AP-1 transcription complex. *Oncogene*. 1999; **18**: 3187-98.
- Spotila LD, Hirai H, Rekosh DM, LoVerde PT:** A retrotransposon-like short repetitive DNA element in the genome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Chromosoma*. 1989; **97**: 421-28.
- Sturrock RF:** The parasites and their life cycle. Human schistosomiasis. 1-23, Jordan P, Webbe G, Sturrock RF: CAB International University Press, Cambridge, 1993
- Suo Z & Johnston KA:** RNA secondary structure switching during DNA synthesis catalyzed by *HIV-1* reverse transcriptase. *Biochemistry*. 1997; **36**: 14778-85.
- Tabara H, Grishok A, Mello CC:** RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science*. 1998; **282**: 430-1.
- Talla E, de Medonca RL, Degand I, Goffeau A, Ghislain M:** *Schistosoma mansoni* Ca²⁺-ATPase SMA2 restores viability to yeast Ca²⁺-ATPase-deficient strains and functions in calcineurin-mediated Ca²⁺ tolerance. *J Biol Chem*. 1998; **273**: 27831-40.
- Tanguay RL & Gallie DR:** Translational efficiency is regulated by the length of the 3' untranslated region. *Mol Cell Biol*. 1996; **16**: 146-56.
- Taylor A, Erba HP, Muscat GE, Kedes L:** Nucleotide sequence and expression of the human skeletal alpha-actin gene: evolution of functional regulatory domains. *Genomics*. 1988; **3**: 323-36.
- Taylor NJ & Fauquet CM:** Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA Cell Biol*. 2002; **21**: 963-77.
- The C. elegans Sequencing Consortium:** Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*. 1998; **282**: 2012-8.
- Thomas JL, Da Rocha M, Besse A, Mauchamp B, Chavancy G:** 3xP3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards. *Insect Biochem Mol Biol*. 2002; **32**: 247-53.
- Tosi LR & Beverley SM:** Cis and trans factors affecting *Mos1 mariner* evolution and transposition in vitro, and its potential for functional genomics. *Nucleic Acids Res*. 2000; **28**: 784-90.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J:** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; **76**: 4350-4354.
- Tsien RY:** The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*. 1998; **67**: 509-44.
- Uchida M, Shimatsu Y, Onoe K, Matsuyama N, Riki R, Ikeda JE, Imai H:** Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection. *Transgenic Res*. 2001; **10**: 577-82.

- Underwood JCE:** Pathology of the Nucleus. Springer, Berlin, Germany, 1990.
- van der Velden AW, Voorma HO, Thomas AA:** Vector design for optimal protein expression. Biotechniques. 2001; **31**: 572. 574. 576-80. passim.
- van Luenen HG & Plasterk RH:** Target site choice of the related transposable *Tc1* and *TC3* of *Caenorhabditis elegans*. Nucleic Acids Res. 1994; **22**: 262-9.
- Vivinus S, Baulande S, van Zanten M, Campell F, Topley P, Ellis JH, Dessen P, Coste H:** An element within the 5' untranslated region of human HSP70 mRNA which acts as a general enhancer of mRNA translation. Eur J Biochem. 2001; **268**: 1908-17.
- von Janowsky B & Zelck UE:** Antioxidant enzymes in immune evasion of larval schistosomes (C.6). Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Parasitology. 33-34, DGP & NVP: Abstract Book. Lübeck-Travemünde, 3.2002
- Vos JC, De Baere I, Plasterk RH:** Transposase is the only nematode protein required for in vitro transposition of *TC1*. Genes Dev. 1996; **10**: 755-61.
- Wahlers A, Kustikova O, Zipfel PF, Itoh K, Koester M, Heberlein C, Li Z, Schiedlmeier B, Skerka C, Fehse B, Baum C:** Upstream conserved sequences of mouse leukemia viruses are important for high transgene expression in lymphoid and hematopoietic cells. Mol Ther. 2002; **6**: 313-20.
- Wang W, Swevers L, Iatrou K:** *Mariner* (*Mos1*) transposase and genomic integration of foreign gene sequences in *Bombyx mori* cells. Insect Mol Biol. 2000; **9**: 145-55.
- Wei W, Gilbert N, Ooi SL, Lawler JF, Ostertag EM, Kazazian HH; Boeke JD, Moran JV:** Human *L1* retrotransposition: cis preference versus trans complementation. Mol Cell Biol. 2001; **21**: 1429-39.
- Werner T:** Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters. Mamm Genome. 1999; **10**: 168-75.
- WHO:** Fact sheet No. 115. 1996. www.who.org.
- William S, Sabra A, Ramzy F, Mousa M, Demerdash Z, Bennett JL, Day TA, Botros S:** Stability and reproductive fitness of *Schistosoma mansoni* isolates with decreased sensitivity to praziquantel. Int J Parasitol. 2001; **31**: 1093-100.
- Willimzig M:** LiCl-boiling method for plasmid mini-preps. Trends Genet. 1985; **1**: 158.
- Wilson D, Sheng G, Lecuit T, Dostatni N, Desplan C:** Cooperative dimerization of paired class homeo domains on DNA. Genes Dev. 1993; **7**: 2120-34.
- Wimmer EA:** Innovations: applications of insect transgenesis. Nat Rev Genet. 2003; **4**: 225-32.
- Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connelly C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Gentalen E, Giaever G, Hegemann JH, Jones T, Laub M, Liao H,**

- Davis RW, et al.:** Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*. 1999; **285**: 901-6.
- Wippersteg V, Kapp K, Kunz W, Jackstadt WP, Zahner H, Grevelding GC:** HSP70-controlled GFP expression in transiently transformed schistosomes. *Mol Biochem Parasitol*. 2002a; **120**: 141-50.
- Wippersteg V, Kapp K, Kunz W, Grevelding GC:** Characterization of the cysteine protease ER60 in transgenic *Schistosoma mansoni* larvae. *Int J Parasitol*. 2002b; **32**: 1219-24.
- Wlodawer A:** Crystal structures of catalytic core domains of retroviral integrases and role of divalent cations in enzymatic activity. *Adv Virus Res*. 1999; **52**: 335-50.
- Wong JY, Harrop SA, Day SR, Brindley PJ:** Schistosomes express two forms of cathepsin D. *Biochim Biophys Acta*. 1997; **1338**: 156-60.
- Wormington M:** Unmasking the role of the 3' UTR in the cytoplasmic polyadenylation and translational regulation of maternal mRNAs. *Bioessays*. 1994; **16**: 533-5.
- Yang F, Moss LG, Phillips GN Jr:** The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 1996; **14**: 1246-51.
- Yang TT, Cheng L, Kain SR:** Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res*. 1996; **24**: 4592-3.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J:** Improved M13 phage cloning vector and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 1985; **33**: 103-19.
- Yarbrough D, Wachter RM, Kallio K, Matz MV, Remington SJ:** Refined structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; **98**: 462-7.
- Zarudnaya MI, Kolomiets IM, Potyahaylo AL, Hovorun DM:** Downstream elements of mammalian pre-mRNA polyadenylation signals: primary, secondary and higher-order structures. *Nucleic Acids Res*. 2003; **31**: 1375-86.
- Zelenin AV, Alimov AA, Barmintzev VA, Beniumov AO, Zelenina IA, Krasnov AM, Kolesnikov VA:** The delivery of foreign genes into fertilized fish eggs using high-velocity microprojectiles. *FEBS Lett*. 1991; **287**: 118-20.
- Zemzoumi K, Dissous C, Cochu A, Trolet J, Capron A, McNair A:** *Schistosoma mansoni*: interaction of nuclear extracts with the CCAAT-binding site revealed by gel shift assay. *Exp Parasitol*. 1995; **80**: 149-54.
- Zhang L, Sankar U, Lampe DJ, Robertson HM, Graham FL:** The *Himar1* mariner transposase cloned in a recombinant adenovirus vector is functional in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 1998; **26**: 3687-93.
- Zhang S, Gu J, Yang NS, Kao C, Gardner TA, Eble JN, Cheng L:** Relative promoter strengths in four human prostate cancer cell lines evaluated by particle bombardment-mediated gene transfer. *Prostate*. 2002; **51**: 286-92.

- Zhou X, Acosta L, Willingham AL 3rd, Leonardo LR, Minggang C, Aligui G, Zheng F, Olveda R:** Regional Network for Research, Surveillance and Control of Asian Schistosomiasis (RNAS). *Acta Trop.* 2002; **82**: 305-11.
- Zhu Y, Dai J, Fuerst FG, Voytas DF:** Controlling integration specificity of a yeast retrotransposon. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; **100**: 5891-5.

Sequenzen

```

Ca1 5' L24159      1 CCTAACCGAATCTATTCTGTCGTGATAAAACAATTGTATCGTCTTAATTGG 50
BSK-C              1 CCTAACCGAATCTATTCTGTCGTGATAAAACAATTGTATCGTCTTAATTGG 50
                    *****

Ca1 5' L24159      51 TGA CTGTCTATAAAACACAGGGTCTTAAGAGGACATTAGCATGTATTAGG 100
BSK-C              51 TGA CTGTCTATAAAACACAGGGTCTTAAGAGGACATTAGCATGTATTAGG 100
                    *****

Ca1 5' L24159      101 AGCAAACCGAGAAAAT-GTAAATTAAGGAGATTGCTGCATAGGTTAGTCCG 150
BSK-C              101 AGCAAACCGAGAAAATTGTAAATTAAGGAGATTGCTGCATAGGTTAGTCCG 150
                    *****

Ca1 5' L24159      151 TAGACTTTCATTGAATAATCCGTGTTCA GTACCCCTTGACCCTGAAATTCA 200
BSK-C              151 TAGACTTTCATTGAATAATCCGTGTTCA GTACCCCTTGACCCTGAAATTCA 200
                    *****

Ca1 5' L24159      201 TTGATCTGCAGTCTAAAGTAGGAATGGTTGGATGGATAGTTTGCCTAGGG 250
BSK-C              201 TTGATCTGCAGTCTAAAGTAGGAATGGTTGGATGGATAGTTTGCCTAGGG 250
                    *****

Ca1 5' L24159      251 CTTGGTAAAATAATGAAAGTATAACTGGTTCACGGGGAATAAGATCTTAT 300
BSK-C              251 CTTGGTAAAATAATGAAAGTATAACTGGTTCACGGGGAATAAGATCTTAT 300
                    *****

Ca1 5' L24159      301 ATTATGAACATATTTAAAAGAAGATGGCTTCTGT TAGTTTTGCATGTCTC 350
BSK-C              301 ATTATGGACATATTTAAAAGAAGATGGCTTCTGT TAGTTTTGCATGTCTC 350
                    *****

Ca1 5' L24159      351 GCACTAAATAAATGATATTTCTGACAAAATTCTGTAGCGATCAGTTGAG 400
BSK-C              351 GCACTAAATAAATGATATTTCTGACAAAATTCTGTAGCGATCAGTTGAG 400
                    *****

Ca1 5' L24159      401 GCGTGAAAAAGGTGTGCCTTATTACTGATTTTATGGATTTGTGAAACATAT 450
BSK-C              401 GCGTGAAAAAGGTGTGCCTTATTACTGATTTTATGGATTTGTGAAACATAT 450
                    *****

Ca1 5' L24159      451 ACAGATAAAATCTATTGTTATTCAGTTAAATGTGGGTTTCTTGAAAGAT 500
BSK-C              451 ACAGATAAAATCTATTGTTATTCAGTTAAATGTGGGTTTCTTGAAAGAT 500
                    *****

Ca1 5' L24159      501 ATTGTTTAAACGGTTGAAAATTGTTTCGGTAACACTTTTGTGGAGTTCTGT 550
BSK-C              501 ATTGTTTAAACGGTTGAAAATTGTTTCGGTAACACTTTTGTGGAGTTCTGT 550
                    *****

Ca1 5' L24159      551 GATTGGCCGCGATCTACATATATAAGTGTTGTGGTCGTGATATGACTAAC 600
BSK-C              551 GATTGGCCGCGATCTACATATATAAGTGTTGTGGTCGTGATATGACT 600
                    *****

Ca1 5' L24159      601 GCAACACGGTTTTGTCTGTCAGG 623

```

BSK-C Sequenzvergleich zwischen dem PCR-Produkt des CAL-5'-Bereiches und der publizierten Sequenz (L24159) (siehe 2.1.2)

```

GST28 5' M98271 1 GTGAATGCGACTGCTGAGGAGTCCCACAATAGGGCGATACGGACGTCCAG 50
BSK-G 1 GTGAATGCGACTGCTGAGGAGTCCCACAATAGGGCGATACGGACGTCCAG 50
*****

GST28 5' M98271 51 TGCTTCCAGGTTTTCCATCGGTAATCTAGCTTCATTTGACTCATGATCAC 100
BSK-G 51 TGCTTCCAGGTTTTCCAT-GGTAATCTAGCTTCATTTGACTCATGATCAC 100
*****

GST28 5' M98271 101 AACTGCTAAAAAAACATCGAGAACGGTTTACATGTTCAATGAATCGAGT 150
BSK-G 101 AACTGCTAAAAAAACATCGAGAACGGTTTACATGTTCAATGAATCGAGT 150
*****

GST28 5' M98271 151 CAAATTTGTCTGCTTAATTTTATTGGTCACTCTTTCACAGCCAATGAGG 200
BSK-G 151 CAAATTTGTCTGCTTAATTTTATTGGTCACTCTTTCACAGCCAATGAGG 200
*****

GST28 5' M98271 201 CACTCAATAAATCAGCGAATAGAAATGAAATATTTACAGTTAAAATCAAG 250
BSK-G 201 CACTCAATAAATCAGCGAATAGAAATGAAATATTTACAGTTAAAATCAAG 250
*****

GST28 5' M98271 251 TAGTTACACTATTGGCCGATCTGTTTACTAAATGACTATTTAATAGTCAC 300
BSK-G 251 TAGTTACACTATTGGCCGATCTGTTTACTAAATGACTATTTAATAGTCAC 300
*****

GST28 5' M98271 301 AGCTCAGATAGTTAGCACTGTTTTGTCTATTTGCAAG 337
BSK-G 301 AGCTCAGATAGTTAGCACTGTTTTGTCTATTTGCAAG 337
*****

```

Sequenzvergleich zwischen dem PCR-Produkt des GST28-5'-Bereiches und der publizierten Sequenz (M98271) (siehe 2.1.2)

```

HSP70 5' L02415 1 GAATTCGATTAGCACTAAGAAGTAGGCAAACATGACATAATAATGTACAA 50
BSK-H 1 GAATTCGATTAGCACTAAGAAGTAGGCAAACATGACATAATAATGTACAA 50
*****
HSP70 5' L02415 51 CTCGGTGACTAATCCGTCTGAACTGAACTATGCCCAACCCCGAAATATCG 100
BSK-H 51 CTCGGTGACTAATCCGTCTGAACTGAACTATGCCCAACCCCGAAATATCG 100
*****
HSP70 5' L02415 101 CACGTGTTAGTTCAACTACTTATAATTATGTCAGTAGTCAAACCGATATT 150
BSK-H 101 CACGTGTTAGTTCAACTACTTATAATTATGTCAGTAGTCAAACCGATATT 150
*****
HSP70 5' L02415 151 GGAATGTTTTTTTGC GTTCGAGGTTGTGAATGTGTGAATGGGATAGATGCA 200
BSK-H 151 GGAATGTTTTTTTGC GTTCGAGGTTGTGAATGTGTGAATGGGATAGATGCA 200
*****
HSP70 5' L02415 201 CGTCTTGTTTTTTGTCGATTTGTCCACACTGGCCAGACAATTGTGTTTTT 250
BSK-H 201 CGTCTTGTTTTTTGTCGATTTGTCCACACTGGCCAGACAATTGTGTTTTT 250
*****
HSP70 5' L02415 251 ATTAGGCACCTTGTATCGCATTGTACTTAGGGAGGCTATACGTCGAATTT 300
BSK-H 251 ATTAGGCACCTTGTATCGCATTGTACTTAGGGAGGCTATACGTCGAATTT 300
*****
HSP70 5' L02415 301 CGACTAGGAAACCATCCTGTCTGTGAGTATTTGGTCAGTCGTCTGATGGT 350
BSK-H 301 CGACTAGGAAACCATCCTGTCTGTGAGTATTTGGTCAGTCGTCTGATGGT 350
*****
HSP70 5' L02415 351 TGAGTGTGATTGGCTAATAGCAAATACTTGTGACAGGCCATTGGTCGAT 400
BSK-H 351 TGAGTGTGATTGGCTAATAGCAAATACTTGTGACAGGCCATTGGTCGAT 400
*****
HSP70 5' L02415 401 TGTTTTCTATCGAAGGTCATAGAAAGTTCTAGTACGTTCTACGTGAAAAG 450
BSK-H 401 TGTTTTCTATCGAAGGTCATAGAAAGTTCTAGTATGTTCTACGTGAAAAG 450
*****
HSP70 5' L02415 451 GATTAAAGAGGTGTACAGCTTGTTGTAGTGTTAATTGAGTGACTTGGCT 500
BSK-H 451 GATTAAAGAGGTGTACAGCTTGTTGTAGTGTTAATTGAGTGACTTGGCT 500
*****
HSP70 5' L02415 501 GCTTTTGTTTGTTCGTCTTAACATATCTTGGA 532
BSK-H 501 GCTTTTGTTTGTTCGTCTTAACATATCTTGGA 532
*****

```

Sequenzvergleich zwischen dem PCR-Produkt des HSP70-5'-Bereiches und der publizierten Sequenz (L02415) (siehe 2.1.2)


```

LTR BK000439   1 TGTAGCTGTAATAATTCCCCAAATCAATAGCTCTTTAAGTGTTCGACA   50
LTR            1 TGTAGCTGTAATAAGTTCCCCAAATCAATAGCTTTCTAAGTGTTCGATA   50
                ***** * ***** *
LTR BK000439   51 TTGGATGCTGACCACGTTGTTTAAAGTGGACTTGTTTAACTGAAGGCTTTC   100
LTR            51 TTGGATGCTGACCACGTTGTTTAAAGTGGACTTGTTTAACTGAAGGCTTTC   100
                *****
LTR BK000439  101 GGTCATGCATCCGTACCAGATCACGTTWCGACMCAGCGTGGGACACAGCT   150
LTR            101 GGTCATGCATCCGTACAAGATCACGTTTCAACTCGGCGTGGGACACTGCT   150
                ***** * * * *****
LTR BK000439  151 CCTACGTTTCAYTAGCCAGCTTAGAGTAAACGCTTCTCGATATATTGATAA   200
LTR            151 CCTACGTTCTACTAGTCAGCTTAGAATAAACGTTCTCGATATATTGATAA   200
                ***** * *****
LTR BK000439  201 CGHATCAAATATATCTTTCCTACCTCTTCTCGTCTGACTTCTGATTTCTA   250
LTR            201 CGTATCAAATATATCTTTCCTACCTCTTCTCGTCTGACTTCTGATTTCTA   250
                ** *****
LTR BK000439  251 WCCGAYTGGGAAASRCTTCGAATATAGAAGGTGCTACTGGTTKCTAGTTG   300
LTR            251 TTTGGCCAAGAAGG-CTTCGATTATGGAAGGTGCTACTGGTAGCTAATTG   299
                *   ***   *****   ***   *****
LTR BK000439  301 TAAAACTASAAYAYYSKTBTATC                               324
LTR            300 TAAAGTTAGAATACTAGTCGTATCCTCA                               327
                ***** * * * * *

```

Sequenzvergleich zwischen dem PCR-Produkt des LTR und der publizierten Konsensus-Sequenz (BK000439) (siehe 2.5.2)

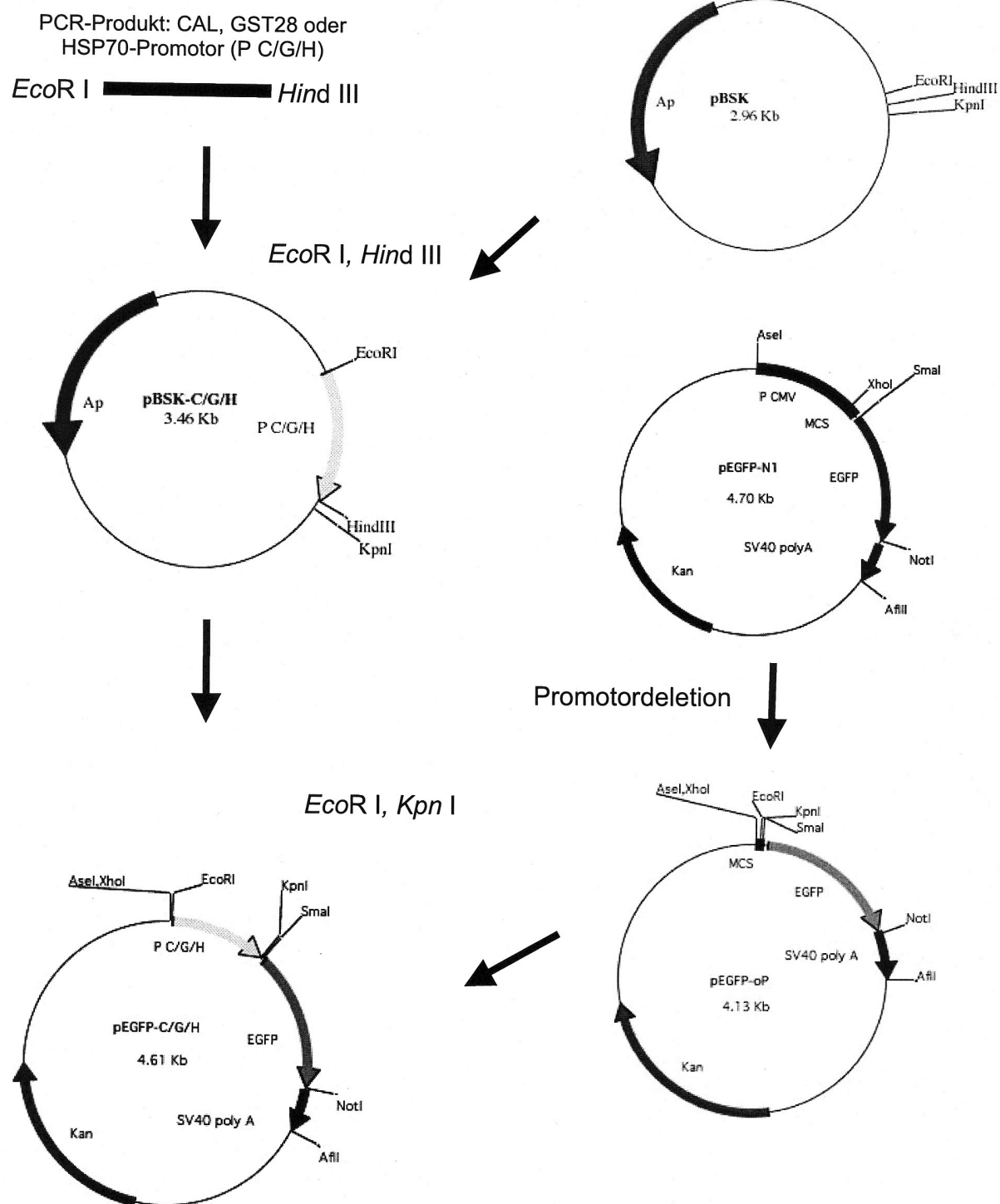
(Ase I;Xho I)

EGFP-oP TAGTTATTATCGAGCTCAAGCTT

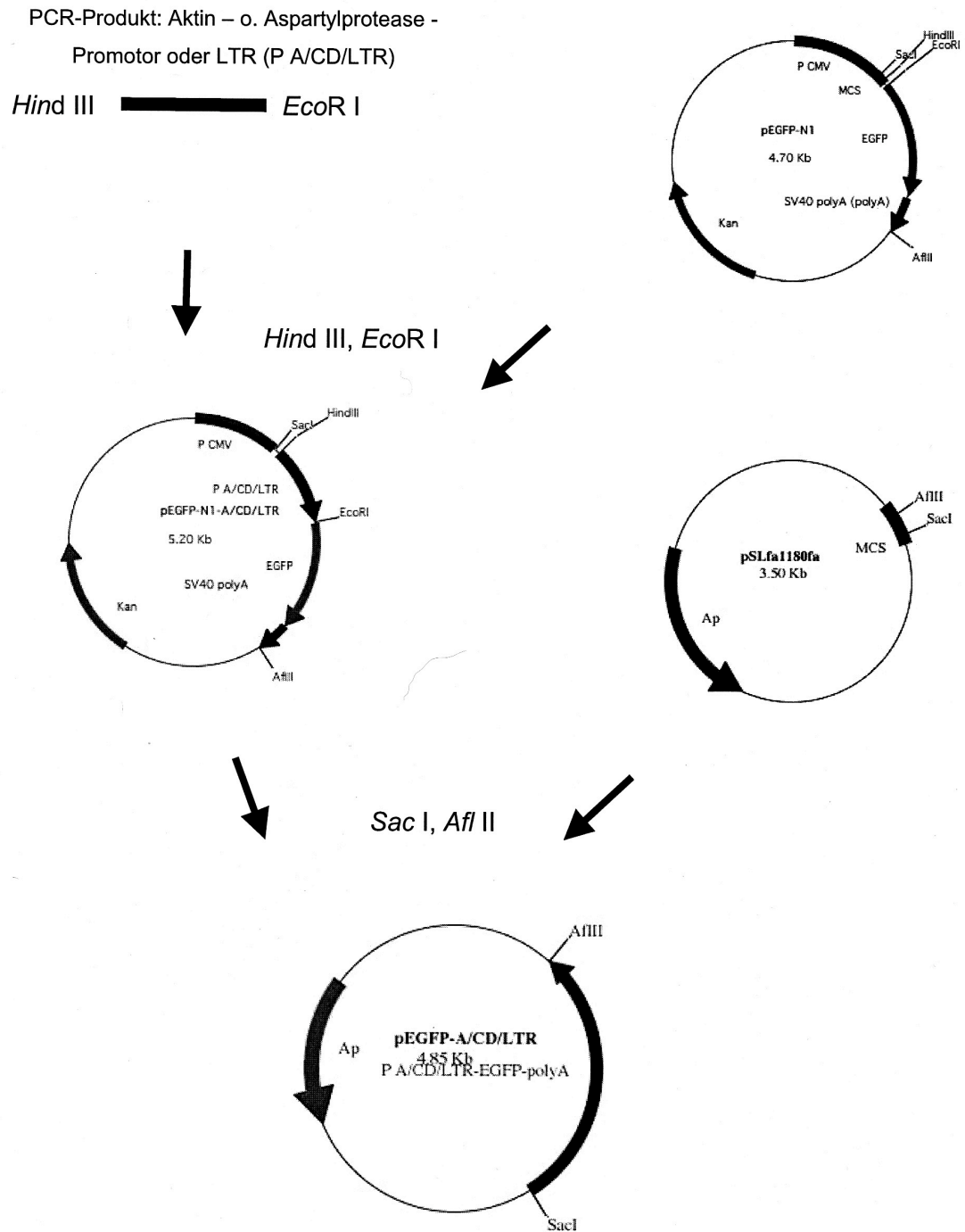
U55762 1 6 614

Sequenzvergleich zwischen EGFP-oP und der Sequenz des Ursprungsplasmids pEGFP-N1 (U55762) zur Überprüfung der Promotordeletion: Angegeben sind die Positionen für die Ase I und die Xho I Schnittstellen in pEGFP-N1 im Vergleich zu ihrer Lage in pEGFP-oP (siehe 2.1.3)

Klonierungsschemata



Schema zur Klonierung von pEGFP-C/G/H (siehe 2.1.4)



Schema zur Klonierung von pEGFP-A/CD/LTR (siehe 2.3.4 und 2.5.2)

Publikationen und Tagungsbeiträge

Copeland CS, Brindley PJ, **Heyers O**, Michael SF, Johnston DA, Williams DL, Ivens AC, Kalinna BH: *Boudicca*, a retrovirus-like long terminal repeat retrotransposon from the genome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. **J Virol.** 2003 Jun; **77(11): 6153-66.**

Heyers O, Walduck AK, Brindley PJ, Bleiß W, Lucius R, Dorbic T, Wittig B, Kalinna BH: *Schistosoma mansoni* miracidia transformed by particle bombardment infect *Biomphalaria glabrata* snails and develop into transgenic sporocysts. **Exp Parasitol.** 2003 Oct; **105(2):174-8.**

#Copeland CS, **#Heyers O**, Kalinna BH, Bachmair A, Stadler PF, Hofacker IL, Brindley PJ: The transcribed sequence of *Boudicca*, a *Schistosoma mansoni* retrotransposon: evolutionary and structural analysis. **#These authors contributed equally to this report. Gene.** 2004 März; **329:103-14.**

#Schulmeister A., **#Heyers O**, Morales ME, Brindley PJ, Lucius R, Kalinna BH: Organisation and functional analysis of a *Schistosoma mansoni* aspartic protease promoter. **#These authors contributed equally to this report. Zur Publikation eingereicht.**

Morales ME, Kalinna BH, **Heyers O**, Copeland CS, Schulmeister A, Brindley PJ: An invertebrate orthologue of a mammalian lysosomal aspartic protease: structure and phylogeny of the *Schistosoma mansoni* cathepsin D gene locus. **Gene. Angenommen.**

Heyers O, Schmitt A, Stuckas H, Theuring F, Dorbic T, Wittig B, Lucius R, Kalinna BH: Development of a transgenesis system for schistosomes utilising mobile genetic elements. **20. Tagung der Deutschen und der Niederländischen Gesellschaften für Parasitologie. Lübeck-Travemünde, Deutschland, 20.-23. März 2002.**

Heyers O, Walduck AK, Brindley PJ, Bleiß W, Lucius R, Dorbic T, Wittig B, Kalinna BH: *Schistosoma mansoni* miracidia transformed by particle bombardment infect *Biomphalaria glabrata* snails and develop into transgenic sporocysts. **96. Tagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft und der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie. Berlin, Deutschland, 9.-13.Juni 2003.**

Heyers O, Walduck AK, Brindley PJ, Bleiß W, Lucius R, Dorbic T, Wittig B, Kalinna BH: *Schistosoma mansoni* miracidia transformed by particle bombardment infect *Biomphalaria glabrata* snails and develop into transgenic sporocysts. **21. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie. Würzburg, Deutschland, 17.-20. März 2004.**

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation

Studien zur Transfektion von *Schistosoma mansoni* (Digenea)

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Oliver Heyers

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir während meiner Arbeit mit Rat und vor allem unmittelbarer Hilfe zur Seite standen.

Bedanken möchte ich mich:

- bei Prof. R. Lucius für die Möglichkeit am Lehrstuhl für Molekulare Parasitologie diese Arbeit anfertigen zu dürfen und für anregende Diskussionen und produktive Kritik.
- bei Dr. B. Kalinna (oder lieber formlos Bernd), dem Leiter der Arbeitsgruppe Schistosomen, der mir dieses Projekt anvertraute. Vielen Dank für vielfältige Hilfestellungen und den unerschütterlichen Optimismus !
- bei Prof. Brindley und bei Claudia Copeland aus New Orleans, die mir *Boudicca* anvertrauten und zeigten, dass es so auch geht.
- bei Prof. Fuhr für die Einführung in die Elektroporation.
- bei Tomislav Dorbic und Prof. Wittig für die Gene Gun inkl. der praktischen Gebrauchsanleitung !
- bei Dr. Heiko Stuckas für die Hilfe bei der Mikroinjektion.
- bei Dr. Anna Walduck für die Einführung in die Immunhistochemie und die vielen Stunden am Rasterelektronenmikroskop.
- bei Dr. W. Bleiß und Frau Marko für die mikroskopischen Proben und die vielen Antworten zur Mikroskopie.
- bei Karin Biermann für die Betreuung von *Mus musculus* und *Meriones unguiculatus* und bei Grit Meusel für den Zyklus (!!!) und die gute Laune.

Die Arbeit wäre ohne die Unterstützung durch das Team Schistosomen nicht möglich gewesen. Vielen Dank (!!) für viele Lichtblicke, gute Laune, ernste und fröhliche Gespräche an die erste Crew: Mandy, Jenny, Emanuel, Andrea, Nils, Alex, Bettina und an die zweite Crew: Klaus, Carola, Smitha, Janine.

Bedanken möchte ich mich auch für die gute Stimmung am Institut für Molekulare Parasitologie, zu der jeder seinen Teil beigetragen hat...

Mein Dank gilt auch Marc, Jens, Martin, Frau Lauferweiler-Plass, Rita und Dirk, die mir viel Last abnahmen !!

Besonderer Dank für viel Nähe und Unterstützung gilt auch meinem Bruder Dominik und meinem Vater Norbert und natürlich Marko (!!!!).

Allen, die ich vielleicht vergessen habe, gilt dieses DANKE.